

**GISELE FERNANDA ASSINE PICCHI**

**Identificação e caracterização de TcNUP-1, uma proteína de lâmina nuclear em  
*Trypanosoma cruzi***

**Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Doutor, pelo Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas -  
Área Biologia Celular e Molecular, do Setor  
de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal do Paraná.**

**Orientador: Dr. Stenio Perdigão Fragoso**

**CURITIBA**

**2006**



Quino

O novo incomoda.  
Por quê?  
Porque desafia.  
Mas, queiram ou não, o novo sempre vem.  
E, para nossa felicidade, o novo geralmente vence.  
E, quando o novo vence, a máquina do mundo gira melhor.  
Novos projetos deixam as tristezas numa agenda que não se abre mais.  
Novas crianças surgem para nos dar as mãos.  
Novos passos exigem de nós coragem.  
O novo é belo porque nos muda, nos leva a novas estações.  
O mundo nos torna pessoas melhores porque nos torna novas pessoas.  
O novo é lindo.  
Assim como os sonhos, o novo não envelhece.

Anônimo

"Nosso maior desejo na vida é ter alguém que nos faça fazer o melhor que pudermos".

Ralph Waldo Emerson

Ao **Manhê**, ao **Papai**, e ao **Lê**...

Por tudo o que vocês são e  
representam para mim.  
Por fazerem minha vida tão doce!  
Amor incondicional.  
Sempre. Especiais.  
Obrigada por tudo!





## **AGRADECIMENTOS**

**Muito obrigada...**

**Stenio,**

Você não tem sido só meu orientador de tese, mas meu orientador de vida... Você é o responsável por tudo o que eu sou hoje... Não tenho palavras para agradecer todo seu trabalho, toda sua dedicação, e principalmente, todo o seu carinho. Espero que eu ainda possa retribuir tudo em dobro. Serei sempre sua fã... Muito obrigada!

**Claudia, Marco e Samuel (e posso agradecer ao Stenio mais uma vez???)**

Por vocês serem esse exemplo de Ciência. Quero ser cientista como vocês quando eu “crescer”. Quero ter um pouquinho de cada um de vocês... Tenho o maior orgulho de poder dizer que sou um filhote de todos vocês. Espero poder retribuir esse investimento que vocês fizeram em mim. Muito obrigada de coração por tanta confiança!

**Édio**

Por toda ajuda sempre. Você é culpado por esse trabalho... você e essa “mania” de estudar e estudar... Obrigada por ser meu irmão de coração. Irmãos às vezes brigam, mas se amam pra sempre.

**Leo**

Por ser assim tão curioso, mesmo duvidando de mim às vezes... Por todas as suas perguntas, mas principalmente por aquelas que eu ainda não sabia a resposta!!! Por ser tão amigo e companheiro mesmo quando está mal-humorado.

**Shê**

Por ser amiga. De verdade. Nas horas boas e nas não tão boas assim. Por estar sempre disposta a me ajudar. Sempre. Nunca ouvi um único NÃO, mesmo quando eu merecia...

**Dani**

Por ser assim meio mãezona. Por ter sempre um conselho certo na hora certa.

**Flávia Maria**

Por ter me dado a oportunidade de aprender muito mais do que ensinar. E por ter me agüentado por tanto tempo. Afinal, só você resistiu... Sempre bem humorada. Obrigada também pela coragem, afinal, se não fosse você nós não teríamos antissoro... e o que seria desse trabalho???

**Didi, Lauro, Lucia, Marcinha, Pati e Rô**

Pelas risadas, pelas conversas e pelas discussões (às vezes nem um pouco científicas...)! De uma maneira ou de outra aprendi muito com cada um de vocês.

**Alejandro, Andréa, Bruno e Viviane**

Por terem me recebido tão bem. Por serem amigos, professores e companheiros! Pra toda hora e tarefa... de fitinha de pH até RNA polissomal de aderido 24h em um dia e meta no dia seguinte... Mas principalmente, por terem ajudado a construir tudo o que sei hoje.

**Dani Pavoni**

Pela ajuda valiosa na correção desse trabalho em um momento tão ocupado da sua vida!

**Nilson e Cassiano**

Por vocês serem esses anjos na nossa vida. As salas de parasitas e de preparo de materiais não seriam as mesmas sem vocês. Nem nossos trabalhos. Muito obrigada por fazerem nosso dia-a-dia beeeeeem mais fácil!!!

**Christian, Dani Sunaga e Guto**

Por vocês entenderem um pouquiiiiiiiiiiiiiiiiinho mais de bioinformática que nós.

**Paulo e Tatiana**

Pelos milhares de reações de seqüências que vocês dois fizeram. Desde o seqüenciamento das bibliotecas até as últimas só “pra confirmar uma coisinha”... Obrigada!

**Edilaine e Luís**

Por vocês serem o porto seguro do IBMP. Por estarem sempre dispostos a ajudar: uma ligação, uma caneta, um conselho, números de telefone, um minutinho, uma ajudinha aqui e ali, tudo o que se imaginar... e sempre sorrindo...

**A todos os colegas do IBMP**

Por vocês transformarem nosso local de trabalho em uma grande casa e me fazerem sentir parte dessa grande família. Obrigada a todos, que mesmo sem saber, ajudaram nessa caminhada.

**Dr. Augusto Schrank, Dr. Bruno Dalaggiovanna, Dr. Cezar Sá e Dr. Silvio Zanata**

Pela participação na banca de avaliação desse trabalho, mas principalmente pela valiosa discussão.

**Marco Randi**

Pela enorme paciência que você teve ao me ensinar tudo toda vez que eu usei o confocal! Como liga mesmo? Por que eu não vejo nada? Como eu ligo o laser? Obrigada!

**Marlene**

Por toda a atenção e disponibilidade sempre que eu preciso. Muito obrigada.

**Às agências financiadoras**

Afinal de contas, sem o CNPq, a CAPES, a Fundação Araucária, a FINEP e a FIOCRUZ esse projeto não teria mesmo saído das pretensões...

**Àquele lá de cima**

Por permitir que minha vida seja essa maravilha, esse verdadeiro mar de rosas, onde eu não conheço o sentido da palavra infelicidade nem da palavra solidão. Por colocar pessoas tão maravilhosas no meu caminho...



# SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	xi
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT .....	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 O NÚCLEO .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 O ENVELOPE NUCLEAR.....	2
1.1.1.1 O Complexo de Poro Nuclear.....	3
1.1.1.2 A Lâmina Nuclear .....	6
1.1.1.2.1 Laminas.....	9
1.1.1.2.2 Proteínas nucleares com domínios <i>Coiled-coil</i> .....	12
<b>1.2 O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> .....</b>	<b>13</b>
1.2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	14
1.2.2 O CICLO DE VIDA.....	15
1.2.2.1 O <i>T. cruzi</i> no Laboratório .....	16
1.2.3 BIOLOGIA DO <i>T. CRUZI</i> .....	17
1.2.3.1 O Núcleo do <i>T. cruzi</i> .....	17
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>22</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADOS .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 PREPARO DO MATERIAL .....</b>	<b>26</b>
<b>3.3 PROCEDIMENTOS TÉCNICOS.....</b>	<b>26</b>
3.3.1 CULTIVO DO PARASITA .....	26
3.3.2 EXTRAÇÃO DE DNA E RNA.....	27
3.3.3 CLONAGEM E SEQÜENCIAMENTO DO GENE <i>TcNUP-1</i> .....	27

3.3.4	ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA .....	28
3.3.5	ANÁLISE DO RNAM DO GENE <i>TcNUP-1</i> .....	29
3.3.6	ANÁLISE DAS PECULIARIDADES DO GENE.....	29
3.3.7	CLONAGEM E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE .....	30
3.3.8	PRODUÇÃO DO ANTÍSSORO POLICLONAL .....	31
3.3.9	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA .....	31
3.3.10	LOCALIZAÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA .....	32
3.3.11	ANÁLISE DE INTERAÇÃO PROTÉICA POR ENSAIO DE <i>PULL-DOWN</i> .....	33
3.3.12	ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA (CHIP).....	35
3.3.13	CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DAS SEQUÊNCIAS TcNUP-1 ESPECÍFICAS .....	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO GENE .....	38
4.2	CARACTERÍSTICAS GERAIS .....	42
4.3	EXPRESSÃO DA PROTEÍNA .....	43
4.4	INTERAÇÃO ENTRE AS REPETIÇÕES .....	48
4.5	INTERAÇÃO COM CROMATINA .....	50
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO GENE .....	54
5.2	CARACTERÍSTICAS DA PROTEÍNA.....	55
5.3	INTERAÇÃO COM CROMATINA .....	56
5.4	MAIS QUESTÕES, NOVAS DIREÇÕES.....	58
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>60</b>
	<b>ANEXO A – Resultados das Análises dos dados de Imunoprecipitação de cromatina ...</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – O NÚCLEO .....	1
FIGURA 2 – O ENVELOPE NUCLEAR .....	3
FIGURA 3 – O COMPLEXO DE PORO NUCLEAR .....	4
FIGURA 4 – O PORO MAIS DE PERTO .....	5
FIGURA 5 – MAPEAMENTO DAS NUCLEOPORINAS .....	6
FIGURA 6 – LÂMINA NUCLEAR .....	7
FIGURA 7 – PROTEÍNAS DA LÂMINA NUCLEAR .....	8
FIGURA 8 – ESTRUTURA DOS IF E DAS LAMINAS .....	10
FIGURA 9 – INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNAS DA LÂMINA NUCLEAR .....	11
FIGURA 10 – DESCRIÇÃO DO <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	13
FIGURA 11 – CICLO DE VIDA DO <i>T. cruzi</i> .....	16
FIGURA 12 – ISOLAMENTO DE SUBCOMPARTIMENTOS NUCLEARES .....	21
FIGURA 13 – ANÁLISE DO RNAm .....	39
FIGURA 14 – ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE <i>TcNUP-1</i> .....	40
FIGURA 15 – ANÁLISE DO NÚMERO DE REPETIÇÕES .....	41
FIGURA 16 – PREDIÇÃO DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA TcNUP-1 .....	42
FIGURA 17 – ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO DO GENE <i>TcNUP-1</i> .....	43
FIGURA 18 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO .....	44
FIGURA 19 – LOCALIZAÇÃO CELULAR DA TcNUP-1 .....	45
FIGURA 20 - ANÁLISE DE INTERAÇÃO ATRAVÉS DE ENSAIO TIPO <i>PULL-DOWN</i> .....	49
FIGURA 21 - ANÁLISE DA INTERAÇÃO .....	50
FIGURA 22 – ORGANIZAÇÃO GENÔMICA NO GeneDB .....	55

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES .....	28
TABELA 2 – SEQUÊNCIAS OBTIDAS A PARTIR DA IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA COM TcNUP-1 .....	52

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BCIP	-	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
cDNA	-	DNA complementar
DNA	-	ácido desoxirribonucléico
EDTA	-	ácido etilenodiaminotetracético
FITC	-	Isotiocianato de fluoresceína
IFs	-	filamentos intermediários
IPTG	-	isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
LB	-	Luria-Bertani
NBT	-	nitro-blue tetrazolium
NCB	-	National Center for Biotechnology Information
NPCs	-	complexos de poros nuclear
pb	-	pares de base
PCR	-	reação em cadeia pela polimerase
RNA	-	ácido ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	-	RNA mensageiro
SDS-PAGE	-	eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
TIGR	-	The Institute for Genomic Research
X-gal	-	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

## RESUMO

A lâmina nuclear é uma estrutura fibrilar protéica que está abaixo da membrana nuclear interna. Nos metazoários, as laminas são os componentes estruturais principais dessa estrutura e estão envolvidas em diversos processos nucleares. Os eucariotos que não possuem laminas apresentam proteínas distintas com funções homólogas. Recentemente foi identificada uma proteína com domínio *coiled-coil* em *Trypanosoma brucei*, NUP-1, como o componente filamentosso principal da lâmina nuclear. Entretanto, seu papel exato ainda não foi definido. Com a intenção de sugerir funções para a lâmina nuclear em tripanossomatídeos, nós caracterizamos uma proteína ortóloga à NUP-1 em *Trypanosoma cruzi*. A TcNUP-1 é uma proteína com alta massa molecular e domínios *coiled-coil* e que está localizada na periferia nuclear. Utilizando ensaio de imunoprecipitação de cromatina, nós identificamos alguns de seus sítios de ligação com o DNA. Após a análise das seqüências encontradas, pudemos observar uma associação clara com fragmentos de DNA contendo genes e pseudogenes da família das trans-sialidases, membros da família da proteína gp85 e seqüências relacionadas à SIRE, que estão comumente associadas às regiões subteloméricas dos cromossomos do *T. cruzi*. Baseados nos nossos resultados, nós sugerimos que TcNUP-1 é uma proteína estrutural responsável por ancorar as extremidades dos cromossomos ao envelope nuclear e que, portanto, apresenta um papel essencial na organização nuclear do *T. cruzi*.



## ABSTRACT

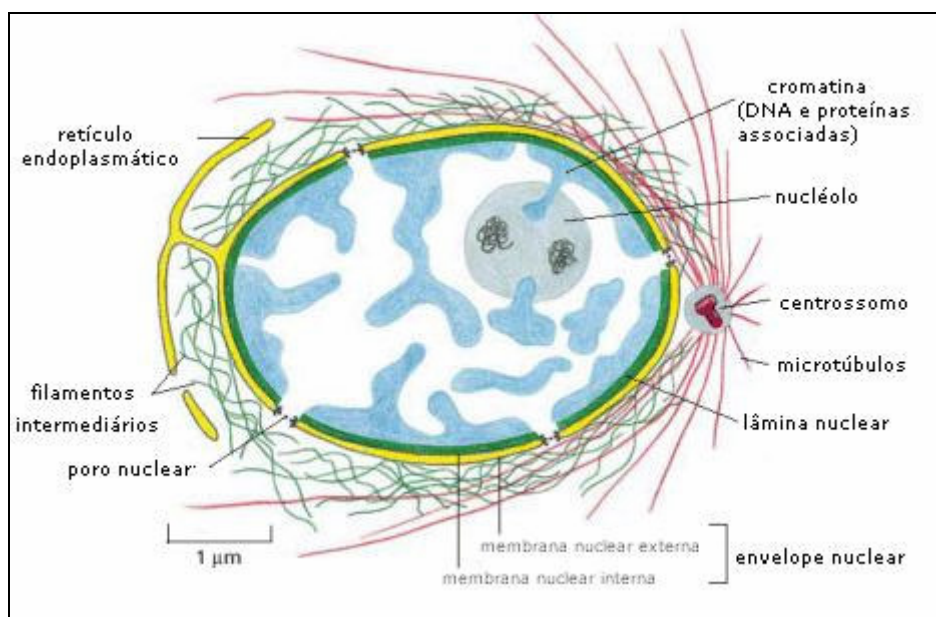
The nuclear lamina is a structure lining the inner nuclear membrane. In metazoans, lamins are the primary structural components of nuclear lamina and are involved in several processes. Eukaryotes lacking lamins present distinct proteins with homologous functions. Recently it was identified a *coiled-coil* protein in *Trypanosoma brucei*, NUP-1, as the major filamentous component of its nuclear lamina. However, its precise role has not been defined. To shed light to this question, we characterized a homologous protein in *Trypanosoma cruzi*, TcNUP-1 and identified some of its *in vivo* DNA binding sites using chromatin immunoprecipitation assay (ChIP). We found a clear association of the TcNUP-1 with DNA sequences containing (pseudo)genes from the ts (trans- sialidase)-like family, members of gp85 gene family and sequences related to SIRE (short interspersed repetitive element), which are commonly associated to the subtelomeric region of the *T. cruzi* chromosomes. Based on our results, we suggest that TcNUP-1 is a structural protein having an essential role in nuclear organization by anchoring the ends of the *T. cruzi* chromosomes to the nuclear envelope.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O NÚCLEO

O núcleo foi a primeira estrutura intracelular descoberta, tendo sido originalmente descrito por Franz Bauer em 1802 e popularizado somente mais tarde, em 1833, por Robert Brown (HARRIS, 1999). Desde então, essa organela (Fig. 1) tem atraído muita atenção, não só devido a seu papel evidente em processos essenciais, mas também devido ao seu comportamento complexo e fascinante durante a divisão celular (VERSCHURE, 2004).

FIGURA 1 – O NÚCLEO



FONTE: adaptada de ALBERTS *et al.*, 2002.

A estrutura e organização funcional do núcleo celular ainda são objetos de debates, e a antiga visão de que serve apenas para proteger o genoma não é mais aceita. Hoje, o núcleo é visto como uma estrutura altamente especializada e organizada que possibilita a formação de um ambiente diferenciado (WIESLANDER, 2004). Dessa maneira, o envelope nuclear deixa

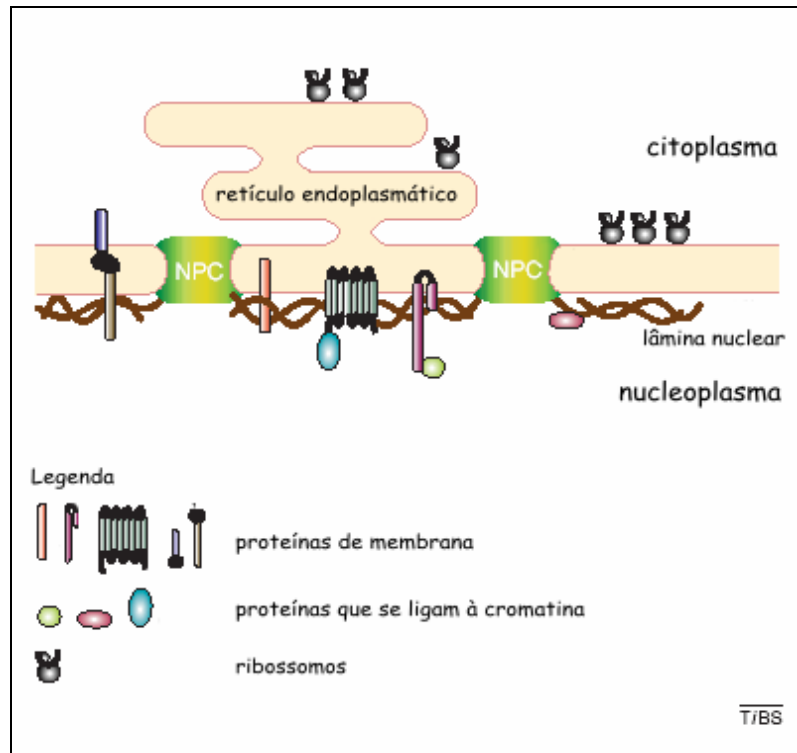
de ser uma simples barreira passiva que delimita o núcleo e passa a apresentar um papel fundamental, já que está envolvido na regulação do tráfego de macromoléculas que são responsáveis pela formação desse ambiente diferenciado (SPECTOR, 1993; D'ANGELO & HETZER, 2006).

### **1.1.1 O ENVELOPE NUCLEAR**

Há aproximadamente 50 anos, a microscopia eletrônica mostrou que o envelope nuclear de ovócitos de anfíbios consiste de duas bicamadas lipídicas (CALLAN & TOMLIN, 1950 *apud* AARONSON & BLOBEL, 1974). Somente com o avanço técnico nas décadas seguintes foi possível revelar a estrutura única e complexa desse sistema de membranas. O envelope nuclear é composto pelas membranas nucleares, pelos complexos de poros nucleares (NPCs, do inglês *nuclear pore complexes*) e pela lâmina nuclear (D'ANGELO & HETZER, 2006).

As duas membranas que compõe o envelope nuclear, a membrana externa e a membrana interna, apresentam características morfológicas distintas. A membrana nuclear externa é contínua com o retículo endoplasmático rugoso, é coberta por ribossomos e fornece locais de fixação para elementos estruturais do citoplasma. A membrana nuclear interna contém um conjunto único de proteínas integrais e proteínas associadas que fornecem locais de fixação para a lâmina nuclear e para a cromatina (BURKE, 2001). Essas duas membranas concêntricas se unem através da membrana do poro nuclear nos locais onde estão os complexos de poros nucleares (Fig. 2).

FIGURA 2 – O ENVELOPE NUCLEAR



Fonte: adaptada de SCHIRMER & GERACE, 2005.

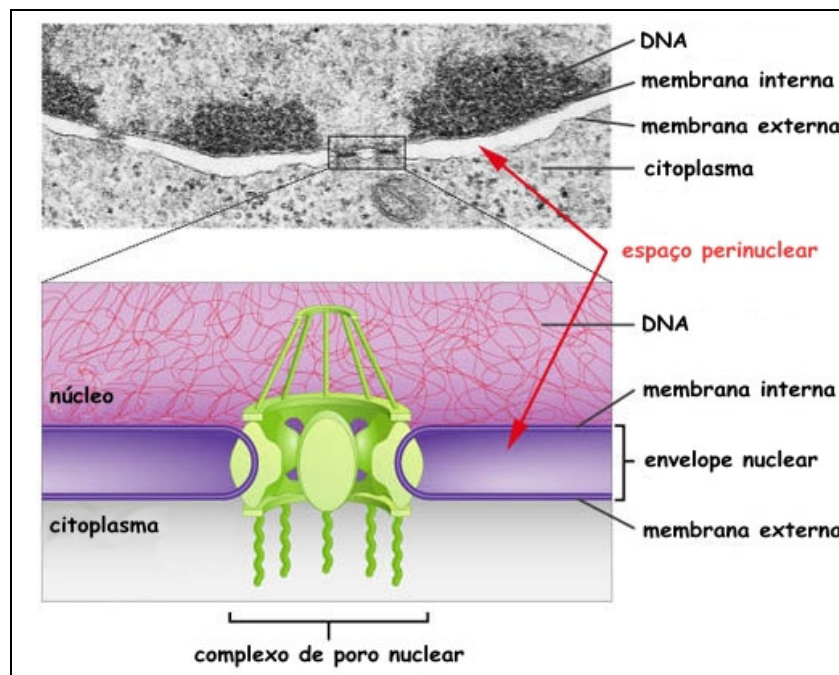
#### 1.1.1.1 O Complexo de Poro Nuclear

Os complexos de poros nucleares funcionam como portais controlando a troca de material entre o núcleo e o citoplasma. São muito eficientes quando comparados a outros transportadores trans-membrana, já que transportam nas duas direções (núcleo ↔ citoplasma) e não necessitam que a carga transportada seja desmontada. Cada NPC possui um canal aquoso que permite a passagem relativamente irrestrita de moléculas pequenas (massa molecular até 60 kDa). Macromoléculas maiores somente passam através do NPC por transporte ativo (WEISS, 2003). Para ultrapassarem essa barreira, as moléculas carregam sinais específicos, que as permitem acessar a maquinaria de transporte núcleo-citoplasmático.

Dessa maneira, a célula garante que apenas as macromoléculas selecionadas podem trafegar entre o núcleo e o citoplasma (WENTE, 2000; ROUT & AITCHISON, 2001).

O NPC é uma das maiores estruturas macromoleculares da célula eucariótica, variando em massa de 50 MDa em leveduras até 125 MDa em vertebrados (ROUT & AITCHISON, 2001). Apesar da grande diferença em massa, a arquitetura geral do NPC parece ser bem conservada entre as espécies (WEIS, 2003; MANS *et al.*, 2004), sendo possível gerar um esquema da estrutura tridimensional do NPC baseado em dados de eletromicroscopia (Fig. 3).

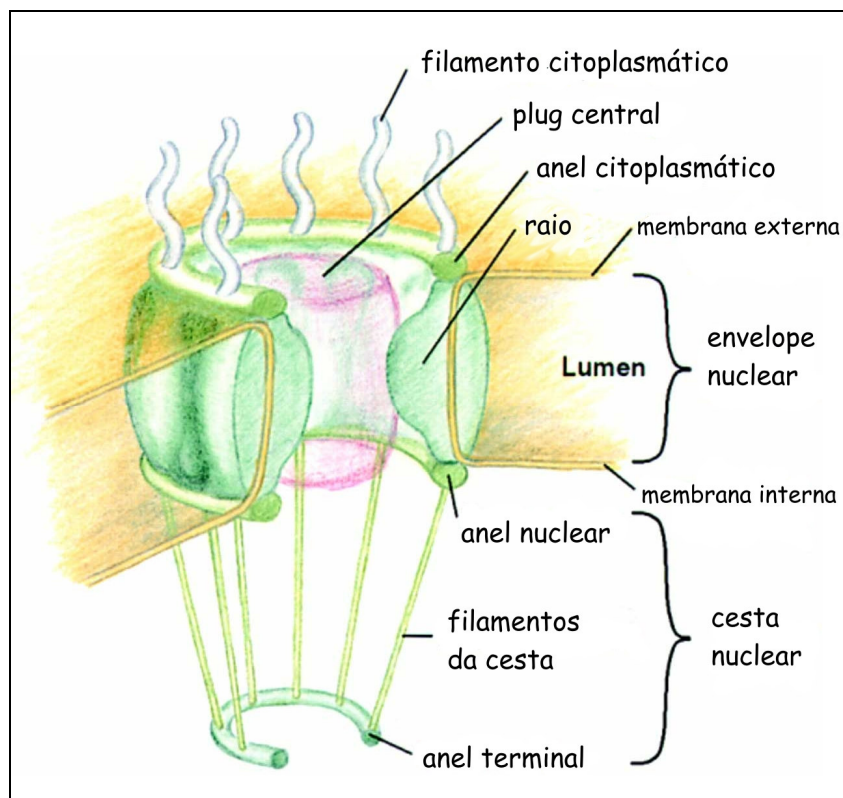
FIGURA 3 – O COMPLEXO DE PORO NUCLEAR



Fonte: adaptada de <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/cells/sf5x4a.jpg>

Essa estrutura obtida por baixa resolução revela que o núcleo do NPC é formado por um cilindro octogonal simétrico, que atravessa o envelope nuclear e envolve um canal central (Fig. 4). Filamentos periféricos voltados tanto para o núcleo como para o citoplasma saem de cada raio do cilindro (ROUT & AITCHISON, 2001; WEIS, 2003).

FIGURA 4 – O PORO MAIS DE PERTO

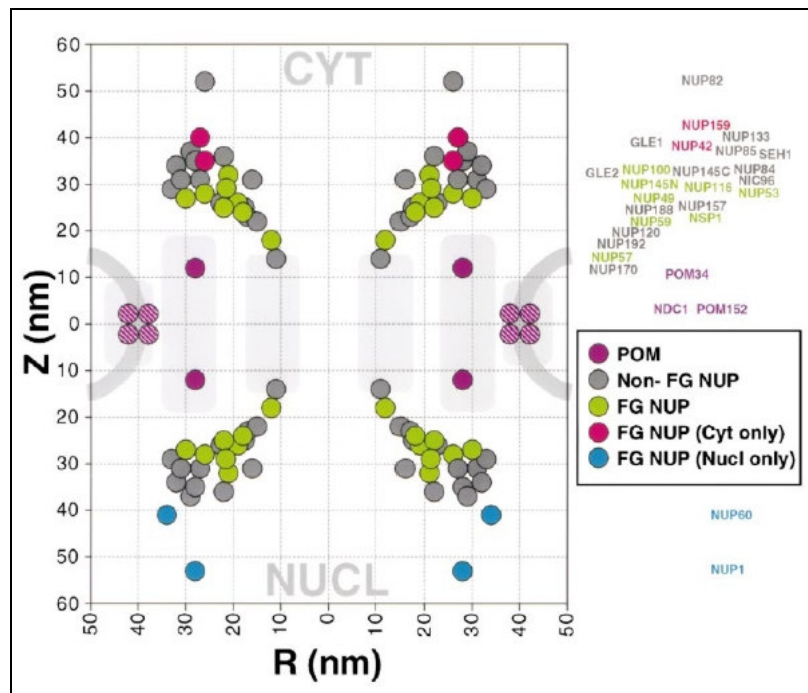


Fonte: adaptada de <http://www.nki.nl/nkidep/h4/maarten/NPC.jpg>

Avanços significativos na compreensão da estrutura e da função dos poros nucleares têm sido alcançados através da análise bioquímica e genética das suas proteínas constituintes, as nucleoporinas (FAHRENKROG & AEBI, 2003). A caracterização detalhada da composição do NPC revelou que apenas um pequeno número de nucleoporinas distintas pode ser encontrado. Apesar do seu enorme tamanho, o poro é composto por cerca de apenas 30 nucleoporinas diferentes, um fato contrastante com o encontrado para os ribossomos que tem massa de 4 MDa e possuem cerca de 80 proteínas diferentes. Essa observação leva à pergunta de como uma estrutura tão grande pode ser construída por tão poucas proteínas. A resposta parece estar ligada à simetria da estrutura. O NPC é composto por um núcleo cilíndrico de onde saem diversos filamentos periféricos em direção ao núcleo e ao citoplasma (ALLEN *et al.*, 2000). A simetria é mais evidente no núcleo (*plug*) central, que é composto por oito raios idênticos. Todas as nucleoporinas estudadas até hoje estão presentes em múltiplas cópias

(aparentemente 1, 2 ou 4 cópias por raio e, conseqüentemente, 8, 16 ou 32 cópias por poro), sendo que a maioria está localizada na face nuclear e na face citoplasmática do envelope nuclear (ROUT *et al.*, 2000). Combinando essa simetria octogonal com o tamanho relativamente grande de cada nucleoporina, fica claro como é possível existir um complexo tão grande com poucos constituintes (Fig. 5).

FIGURA 5 – MAPEAMENTO DAS NUCLEOPORINAS



Fonte: ROUT *et al.*, 2000.

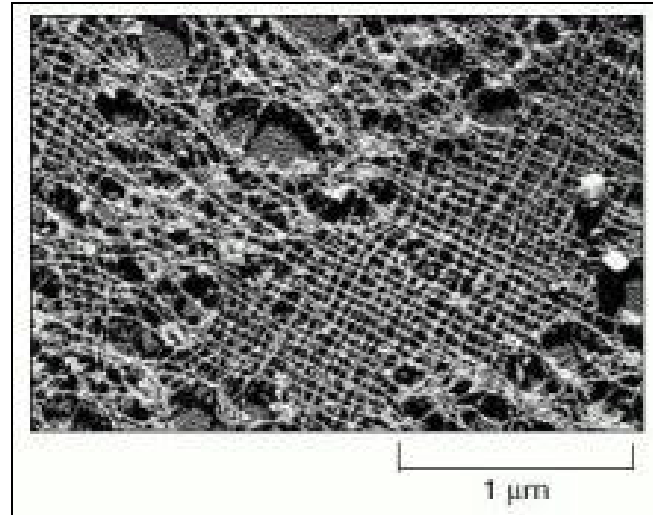
Nota: POM: proteínas integrais de membrana; FG NUP: nucleoporinas com motivos ricos em fenilalanina e glicina.

### 1.1.1.2 A Lâmina Nuclear

A lâmina nuclear é uma estrutura fibrilar protéica que está logo abaixo da membrana nuclear interna (Fig. 6). Muito se descobriu sobre a função da lâmina nuclear desde a publicação dos primeiros trabalhos que mostraram sua presença em invertebrados e

vertebrados (WATSON, 1955; FAWCETT, 1966 *apud* AARONSON & BLOBEL, 1974; AEBI *et al.*, 1986).

FIGURA 6 – LÂMINA NUCLEAR



Fonte: AEBI *et al.*, 1986.

Nota: Eletromicrografia de lâmina nuclear de ovócito de *Xenopus*.

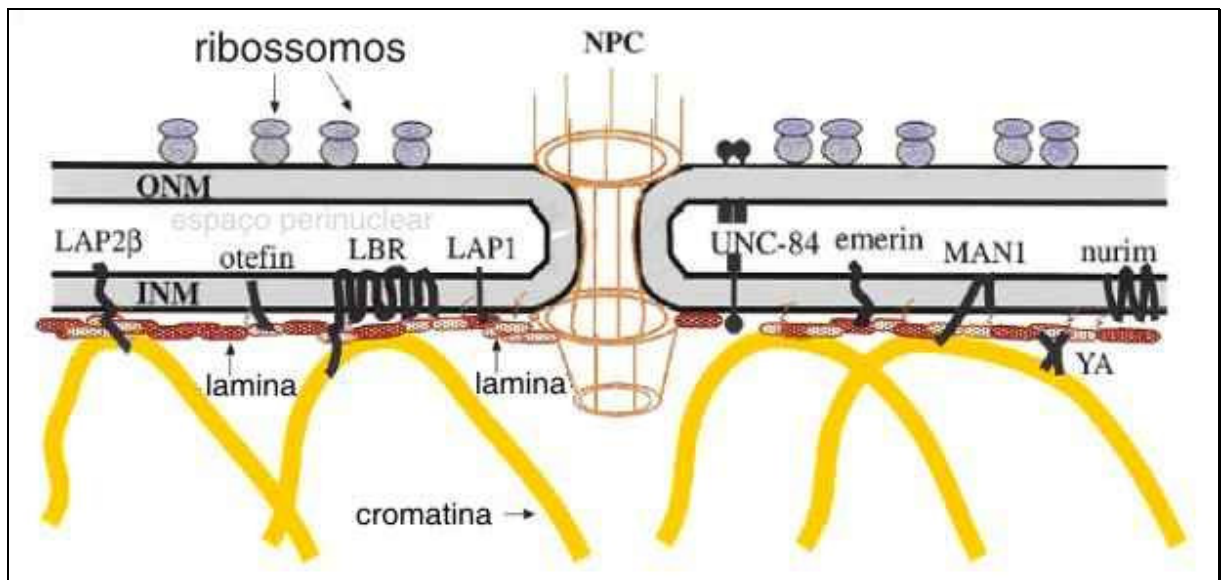
Antigamente, acreditava-se que a lâmina nuclear servia apenas como um esqueleto estático para dar forma e resistência ao núcleo. Hoje em dia, entretanto, muitos estudos têm mostrado que a lâmina nuclear tem um papel importante em diversos processos celulares (HERRMAN & FACKELMAYER, 2005) já que mutações que afetam sua organização têm efeitos significativos no funcionamento celular podendo levar a patologias conhecidas como laminopatias que incluem distrofias musculares, cardiomiopatias e doenças de envelhecimento precoce (DECOSTRE *et al.*, 2005; GRUENBAUM *et al.*, 2005; MARALDI *et al.*, 2006). Associações entre o envelope nuclear e cromatina periférica são vistas há muito tempo (FRANKE, 1974) e sugerem que as proteínas da lâmina são importantes para essa interação (MANS *et al.*, 2004). Muitas das funções que têm sido atribuídas à lâmina nuclear incluem a manutenção da morfologia nuclear (LIU *et al.*, 2000), o correto espaçamento dos complexos de poros nucleares (LENZ-BÖHME *et al.*, 1997), replicação de DNA, regulação



de fatores de transcrição (FOISNER, 2001) e o fornecimento de sítios de ancoragem para a cromatina na periferia nuclear (GERACE & BURKE, 1988; MOIR *et al.*, 1994; GRUENBAUM *et al.*, 2000; HUTCHISON, 2002; MARALDI *et al.*, 2006).

Os principais responsáveis por essa grande diversidade de papéis da lâmina são suas proteínas constituintes. Em metazoários, a lâmina nuclear é composta pelas laminas (STUURMAN *et al.*, 1998) e por um grande grupo de proteínas associadas às laminas como emerina, polipeptídeos 1 e 2 associados às laminas (LAP1 e LAP2), nesprina, receptor de lamina-B (LBR), MAN1, otefina e YA. Algumas proteínas integrais da membrana nuclear interna, incluindo UNC-84, UNC-83, nurina e RFBP, também são consideradas como participantes da lâmina nuclear, já que interagem com as laminas (Fig. 7). A lâmina nuclear é uma estrutura conservada nos metazoários, porém, o número e a complexidade das proteínas associadas estão associados ao grau de evolução dos organismos (MATTOUT-DRUBEZKI & GRUENBAUM, 2003).

FIGURA 7 – PROTEÍNAS DA LÂMINA NUCLEAR



Fonte: adaptada de GRUENBAUM *et al.*, 2000.

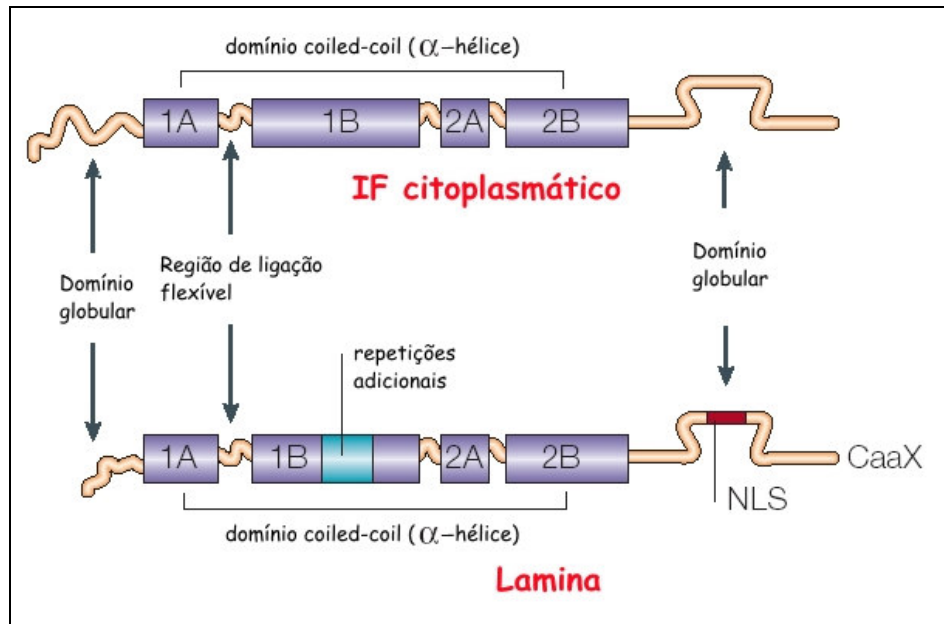
#### 1.1.1.2.1 Laminas

As laminas são os principais componentes estruturais da lâmina nuclear (AARONSON & BLOBEL, 1975; FISHER *et al.*, 1986). Pertencem ao grupo dos filamentos intermediários (IFs) do tipo V e, assim como outros filamentos intermediários, formam estruturas filamentosas (STUURMAN *et al.*, 1998).

Todos os filamentos intermediários estão organizados em um domínio amino-terminal pequeno, uma região central em  $\alpha$ -hélice formando uma estrutura do tipo *coiled-coil* e um domínio carboxi-terminal (Fig. 8). O domínio central, conhecido também como domínio *coiled-coil* de dimerização, é composto por quatro domínios *coiled-coil* que são separados por regiões de ligação flexíveis. Os domínios *coiled-coil* são geralmente organizados em repetições sétuplas, mas as laminas apresentam 42 resíduos extras (seis sétuplos) no domínio 1B em relação aos IFs citoplasmáticos. Além disso, o domínio carboxi-terminal das laminas possui uma sequência sinal de localização nuclear (NLS) e, na maioria, um domínio CaaX Box, que é alvo de modificações como isoprenilação e metilação (HUTCHISON, 2002).

Trabalhos recentes utilizando interferência de RNA têm demonstrado que as laminas são proteínas essenciais para a vida (revisto por MOIR & SPANN, 2001). Dados bioquímicos e genéticos têm sugerido a interação entre laminas e cromatina (BELMONT *et al.*, 1993). As laminas têm mostrado apresentar um papel importante na organização estrutural do núcleo (BLUMENTHAL *et al.*, 2004; FOSTER & BRIDGER, 2005), na replicação e transcrição do DNA (ELLIS *et al.*, 1997; JAGATHEESAN *et al.*, 1999; MOIR *et al.*, 2000; SPANN *et al.*, 2002; MARALDI & LATTANZI, 2005) e na segregação dos cromossomos (LIU *et al.*, 2000).

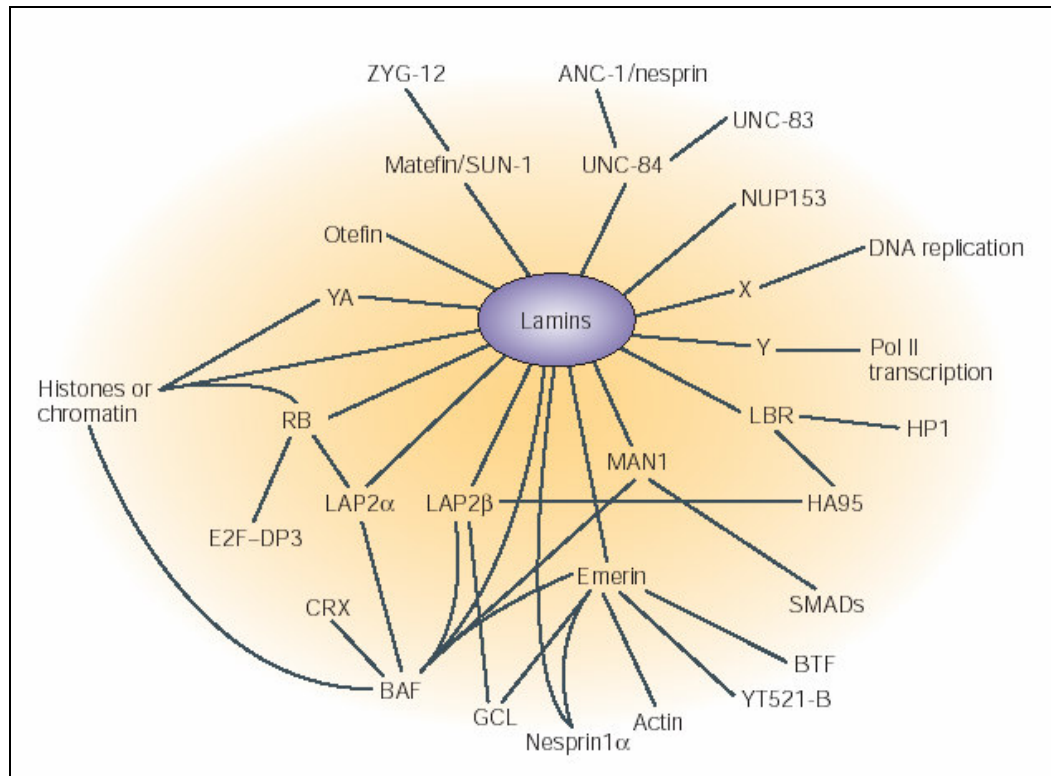
FIGURA 8 – ESTRUTURA DOS IF E DAS LAMINAS



Fonte: adaptada de HUTCHISON, 2002.

As laminas apóiam um amplo espectro de funções através da interação com proteínas que apresentam papéis fundamentais em muitas vias celulares. Dessa maneira, funções nucleares essenciais dependem das laminas. Quando há uma baixa taxa de expressão de lamina em embriões de *Caenorhabditis elegans*, por exemplo, o núcleo apresenta uma cromatina com padrões anormais de condensação durante a intérfase e defeitos graves na segregação dos cromossomos durante a mitose que levam à aneuploidia. Muitas doenças humanas têm sido associadas a mutações nos genes que codificam as laminas, já que muitas proteínas nucleares dependem das laminas para sua correta localização (Fig. 9). Com isso, as mutações nas laminas têm o potencial de alterar a composição protéica da membrana nuclear interna, do nucleoplasma e até mesmo do citoplasma, influenciando em diversos aspectos do funcionamento celular (GRUENBAUM *et al.*, 2005).

FIGURA 9 – INTERAÇÕES ENTRE PROTEÍNAS DA LÂMINA NUCLEAR



Fonte: GRUENBAUM *et al.*, 2005.

Legenda: As linhas conectam pares de proteínas que interagem diretamente in vitro. X e Y representam proteínas ainda não conhecidas; BAF, barrier-to-autointegration factor; BTF, BCL2-associated transcription factor; CRX, cone-rod homeobox; GCL, germ cell-less; HP1, heterochromatin protein-1; LAP1/2β, lamina-associated polypeptides-1 and -2β; LBR, lamin-B receptor; Pol II, RNA polymerase II; RB, retinoblastoma protein; YA, young arrest.

Todo o conhecimento sobre as laminas foi obtido exclusivamente através de estudos em invertebrados e vertebrados já que ainda não foram identificadas em plantas e organismos unicelulares. O genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae* não contém genes para laminas ou para proteínas associadas às laminas (MEWES *et al.*, 1998; BALAKRISHNAN *et al.*, 2006). Essas proteínas parecem estar ausentes também do genoma das plantas (BLUMENTHAL *et al.*, 2004; MANS *et al.*, 2004). Entretanto, considerando a importância fundamental que as laminas e proteínas associadas apresentam em diversos processos é difícil acreditar que elas simplesmente estejam ausentes. A hipótese mais provável, então, seria que as proteínas de envelope nuclear evoluíram separadamente em diferentes organismos, e que

alguns organismos expressam proteínas distintas com função homóloga a das laminas (COHEN *et al.*, 2001; GINDULLIS *et al.*, 2002; HUTCHISON, 2002).

#### 1.1.1.2.2 Proteínas nucleares com domínios *Coiled-coil*

De fato, uma sucessão de trabalhos tem sido publicada desde o final dos anos 80 sugerindo que plantas e outros organismos possuem proteínas com domínios coiled-coil que poderiam substituir as laminas. Proteínas com domínios coiled-coil foram descritas na periferia do núcleo em células de cenoura (MASUDA *et al.*, 1997) e também associadas ao envelope nuclear em tomate e tabaco (MEIER *et al.*, 1996; GINDULLIS & MEIER, 1999; HARDER *et al.*, 2000).

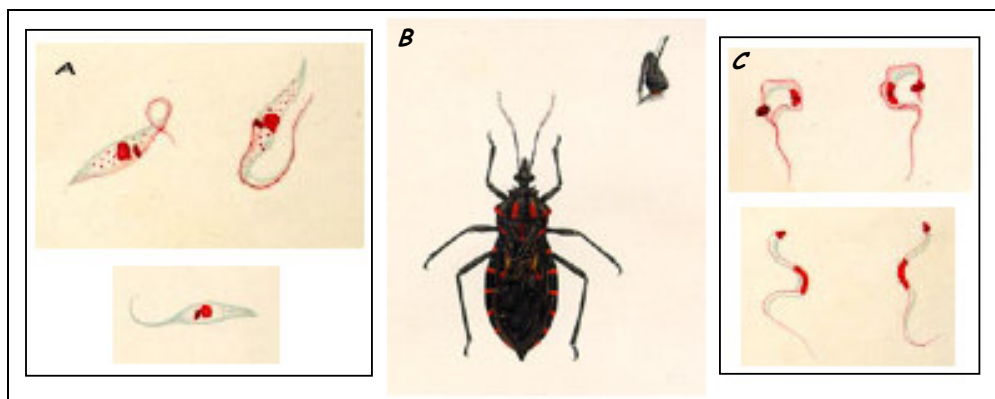
Proteínas com características de lamina aparentemente não estão codificadas no genoma de protozoários da Ordem Kinetoplastida, tais como o *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*, pois o seqüenciamento do genoma desses parasitas não identificou genes que codificam para laminas (EL-SAYED *et al.*, 2005a, 2005b). É provável que proteínas diferentes tenham evoluído para substituir funcionalmente as laminas. De fato, ROUT & FIELD (2001) mostraram que *T. brucei* apresenta uma estrutura robusta na periferia do núcleo semelhante à lâmina nuclear composta principalmente por uma proteína filamentosa com domínios coiled-coil denominada NUP-1. A presença de lâmina nuclear em tripanossomas pode levar a sugestões interessantes sobre sua função já que não estaria envolvida na reformação do envelope nuclear uma vez que esses organismos mantêm a membrana nuclear durante a divisão celular.

## 1.2 O *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* tem despertado um grande interesse, não somente por ser o agente etiológico da doença de Chagas, uma doença grave e de grande importância na América Latina, mas por apresentar algumas características especiais que o tornam um excelente modelo para o estudo de questões biológicas básicas.

O *T. cruzi* foi descrito pela primeira vez por Carlos Chagas em 1909 (Fig. 10). Em um trabalho genial, ele estudou o parasita, seu ciclo evolutivo e a clínica, patologia e epidemiologia da doença (CHAGAS, 1909). Além disso, determinou estudos sobre os vetores e reservatórios, sobre o diagnóstico parasitológico e sorológico, formulou hipóteses importantes sobre a patogenia, verificou a transmissão congênita, chamou a atenção de autoridades e sanitaristas sobre a importância médica e social da parasitose, induziu estudos sobre a melhoria habitacional e impulsionou pesquisas sobre a tripanossomíase entre vários países latino-americanos.

FIGURA 10 – DESCRIÇÃO DO *Trypanosoma cruzi*



Fonte: CHAGAS, 1909.

Nota: A) formas epimastigotas de *T. cruzi*; B) *Conorhinus megistus*, uma das espécies de inseto vetor. No detalhe, a cabeça vista de perfil mostrando a tromba sugadora; C) formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

### 1.2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde, cerca de 13 milhões de pessoas da América Central e América do Sul estão infectadas com *T. cruzi*. Cerca de 25% dessas pessoas infectadas apresentam os sintomas da doença, que podem variar amplamente dependendo da cepa do parasita, do próprio indivíduo e da duração da infecção. É estimado que cerca de 30% dos pacientes cronicamente infectados apresente danos irreparáveis no coração e trato digestivo, resultando em cerca de 14.000 mortes por anos (TDR/WHO, 2005).

A doença pode ser transmitida através de insetos triatomíneos, por transfusão de sangue ou pela transmissão congênita (MOREL & LAZDINS, 2003). Entretanto, algumas medidas simples de controle têm diminuído com sucesso a transmissão do *T. cruzi*: tratamento com inseticidas em áreas onde o inseto vetor se domiciliou e triagem em bancos de sangue. Com isso, a incidência anual de novos casos caiu de 700.000 nos anos 80 para cerca de 200.000 atualmente (TDR/WHO, 2005).

Mesmo assim, a doença de Chagas ainda é um problema sério de saúde. Afeta desproporcionalmente as pessoas mais pobres, especialmente aquelas que vivem em áreas rurais e com baixas condições de moradia onde o inseto vetor encontra refúgio em fendas e rachaduras. A pobreza também limita o acesso do paciente ao tratamento, uma vez que em alguns países esse tratamento tem um custo alto sendo que para alguns, até mesmo a disponibilidade das drogas é limitada. As drogas usadas atualmente (benzonidazol e nifurtimox) podem curar pelo menos 50% dos pacientes se forem administradas durante a fase aguda, mas são ineficazes no estágio crônico depois das lesões no coração e trato digestivo. A patogênese da doença ainda não é muito bem compreendida, e métodos tanto para avaliar sua progressão como para cura ainda não foram desenvolvidos (TDR/WHO, 2005).

Apesar do número de afetados estar diminuindo, a manutenção desse padrão depende da vigilância contínua e intervenção quando necessário. As pesquisas de novos métodos de intervenção, estratégias e políticas têm sido gerenciadas desde 2000 pela Organização Pan-Americana de Saúde, com ênfase no controle dos insetos não-domiciliados e na interrupção da transmissão vetorial. Além disso, o desenvolvimento de pesquisas voltadas para a melhoria do tratamento e também sobre a biologia básica e a patogênese da doença são fundamentais para a compreensão da interação parasita-hospedeiro. A pesquisa básica em biologia do parasita fornece também dados sobre eventos importantes como resistência a drogas, virulência, sinalização celular e apoptose e pode levar à caracterização de enzimas como alvos potenciais para desenvolvimento de drogas (TDR/WHO, 2005).

### 1.2.2 O CICLO DE VIDA

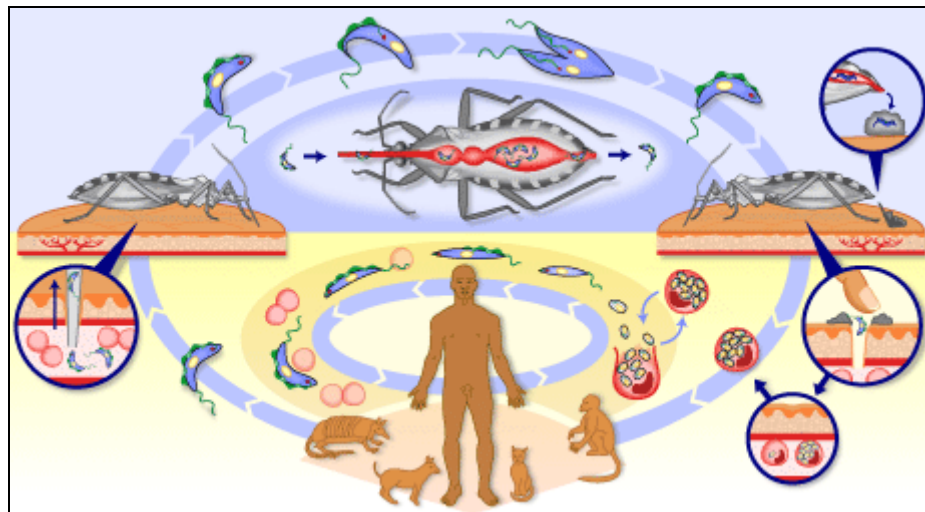
O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae que apresenta um ciclo de vida complexo (Fig. 11). Durante esse ciclo de vida, o *T. cruzi* adota diferentes formas evolutivas que refletem uma adaptação aos distintos habitats e situações biológicas por quais passa ao longo de sua vida no interior do hospedeiro vertebrado e do inseto vetor.

O ciclo tem início no inseto vetor, hemípteros da família Reduviidae, quando ingere formas tripomastigotas do *T. cruzi* durante o repasto sangüíneo em vertebrados contaminados. Ao chegar ao estômago do inseto, os parasitas se transformam em epimastigotas que migram para o intestino, onde se multiplicam. Em seguida, migram para a parte mais posterior do intestino e diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas que são eliminadas com as fezes e urina sendo depositadas na pele ou mucosas do vertebrado. Logo após a penetração na célula, as formas tripomastigotas metacíclicas podem ser encontradas no interior de um



vacúolo, chamado vacúolo parasitóforo. Imediatamente, tem início um processo de transformação para a forma amastigota ao mesmo tempo em que ocorre a destruição da membrana do vacúolo parasitóforo. Então, as formas amastigotas se encontram livre no citoplasma célula hospedeira, e se replicam por divisão celular binária. Em seguida, esses parasitas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos que rompem a célula hospedeira sendo liberados no espaço intercelular. Essas formas têm a capacidade de infectar outras células no mesmo local, ou atingir a corrente sanguínea, podendo infectar novas células ou serem ingeridos pelo inseto vetor fechando o ciclo (de SOUZA, 2000).

FIGURA 11 – CICLO DE VIDA DO *T. cruzi*



Fonte: TDR/Wellcome Trust.

Disponível em: <http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/lifecycle.htm>

### 1.2.2.1 O *T. cruzi* no Laboratório

O fato de que o *T. cruzi* pode ser cultivado facilmente em meio axênico permitiu um avanço considerável em todos os aspectos da pesquisa. A manutenção do parasita na forma epimastigota pode ser feita em LIT (do inglês: *Liver Infusion Tryptose*; CAMARGO, 1964). A diferenciação das formas epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas também

pode ser realizada *in vitro* em condições quimicamente definidas, facilitando enormemente todos os estudos envolvendo o processo de metaciclogênese (CONTRERAS *et al.*, 1985a, 1985b; BONALDO *et al.*, 1988).

### **1.2.3 BIOLOGIA DO *T. CRUZI***

Nos últimos anos, o *T. cruzi* tem sido objeto de intenso estudo sob diferentes aspectos tanto com enfoque celular quanto molecular. O interesse dos pesquisadores em entender fenômenos de regulação da expressão gênica além de aspectos básicos da biologia do *T. cruzi* foi auxiliado pelo atual avanço tecnológico e também pela possibilidade de obtenção *in vitro* de grandes quantidades de parasitas nas diferentes formas evolutivas.

#### **1.2.3.1 O Núcleo do *T. cruzi***

O núcleo do *T. cruzi*, e de outros tripanossomatídeos, tem uma organização estrutural que parece ser similar à encontrada em outras células eucarióticas. É pequeno, medindo cerca de 2,5  $\mu\text{m}$  e, por isso, poucos dados sobre sua organização podem ser obtidos através de microscopia ótica. Nas formas epimastigotas e amastigotas, o núcleo é ligeiramente esférico, enquanto nos tripomastigotas é alongado e localizado na porção central da célula (de SOUZA, 2002).

A membrana nuclear apresenta poros nucleares típicos com diâmetro médio de 80 nm, com cerca de 25 poros por micrômetro quadrado de superfície nuclear (de SOUZA, 2000). A continuidade entre a membrana nuclear externa e o retículo endoplasmático é evidente assim como em outras células eucarióticas (de SOUZA, 2002).

Dados obtidos através de microscopia eletrônica e confocal mostraram que a divisão celular nos tripanossomas ocorre por mecanismo mitótico (da SILVEIRA, 2000). Durante a intérfase, a cromatina se aglomera em massas na periferia do núcleo, logo abaixo da membrana interna e, ocasionalmente, em uma região mais central. No início do processo de divisão celular, ocorre uma dispersão da cromatina, o que confere ao núcleo um aspecto mais homogêneo. O nucléolo que é bem evidente se fragmenta e desaparece, e microtúbulos podem ser observados no interior do núcleo. Quando a divisão se completa, a cromatina e o nucléolo se reorganizam e assumem as posições vistas durante a intérfase, enquanto os microtúbulos desaparecem. Durante todo o processo de divisão a membrana nuclear permanece intacta (de SOUZA, 2002).

Apesar de se apresentar organizada na forma de filamentos nucleossomais típicos (ASTOLFI FILHO *et al.*, 1980; RUBIO *et al.*, 1980), a cromatina dos tripanossomatídeos tem mostrado diversas diferenças quando comparada à de eucariotos superiores. A análise dos cromossomos pelos métodos convencionais de citogenética é praticamente impossível visto que nenhum cromossomo pode ser visualizado nos parasitas em divisão (VICKERMAN & PRESTON, 1970; HECKER *et al.*, 1994; da SILVEIRA, 2000). Análises por microscopia eletrônica mostram que mesmo a heterocromatina apresenta apenas um leve grau de empacotamento (HECKER & GANDER, 1985). A cromatina não apresenta grandes variações em relação ao grau de condensação durante o ciclo de vida, sendo apenas um pouco mais condensada nas formas tripomastigotas (HECKER *et al.*, 1994; SPADILIERO *et al.*, 2002a, 2002b). A presença dessa cromatina pouco compactada poderia ser explicada pela necessidade de respostas imediatas aos sinais externos, visto que esses organismos precisam se adaptar rapidamente às diferentes mudanças de ambiente encontradas no inseto vetor e no hospedeiro vertebrado durante seu ciclo de vida (BELLI, 2000).

Devido à grande importância do núcleo, alguns estudos foram realizados sobre essa estrutura fundamental que contém a maior parte das informações importantes tanto para o controle da divisão celular quanto para o processo de diferenciação que ocorre em alguns tripanossomatídeos (de SOUZA, 2002).

Dentre esses estudos, alguns se concentraram na análise da condensação da cromatina tendo com objetivo a caracterização das histonas (TORO & GALANTI, 1988, 1990; TORO *et al.*, 1992, 1993; BONTEMPI *et al.*, 1994; PUERTA *et al.*, 1994), suas variantes (LOWELL & CROSS, 2004; LOWELL *et al.*, 2005), suas modificações (MARQUES PORTO *et al.*, 2002; da CUNHA *et al.*, 2005) e seus padrões de expressão durante o ciclo de vida do parasita (RECINOS *et al.*, 2001; SABAJ *et al.*, 2001). Além disso, alguns estudos analisaram enzimas-chave em processos como replicação e transcrição que também parecem ter papel importante na manutenção da estrutura da cromatina, como as DNA topoisomerases do tipo II (STRAUSS & WANG, 1990; FRAGOSO & GOLDENBERG, 1992; FRAGOSO *et al.*, 1998).

Entretanto, apenas alguns estudos consideraram especificamente a arquitetura nuclear em tripanossomas, sendo que o interesse nessa área ressurgiu a partir da hipótese de que existe uma ligação entre a atividade gênica e o posicionamento dos genes no núcleo (OGBADOYI *et al.*, 2000). Alguns trabalhos analisaram a organização dos telômeros, mostrando que sua localização sofre modificações durante o ciclo celular e concluindo também que o DNA mostra um posicionamento espacial não-aleatório no núcleo ao longo do ciclo de vida do *T. brucei* (CHUNG *et al.*, 1990; ERSFELD *et al.*, 1999; PEREZ-MORGA *et al.*, 2001).

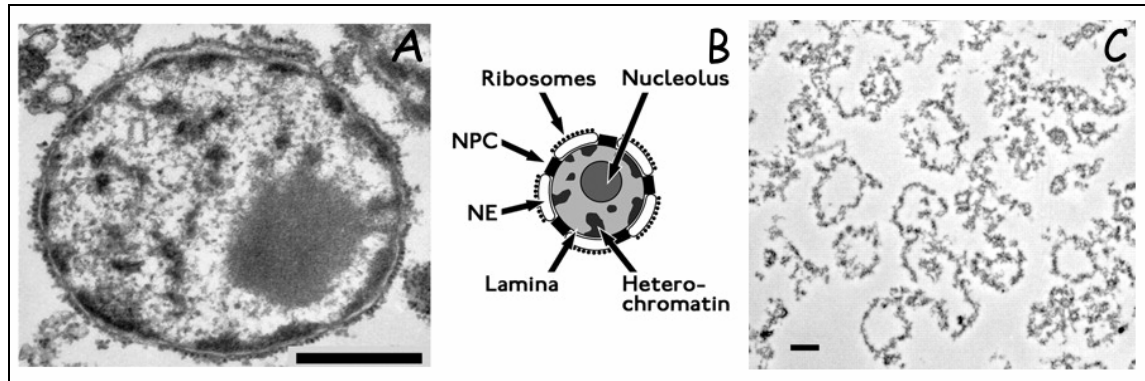
Outros trabalhos mostraram que a localização dos cromossomos em *T. cruzi* depende de processos como replicação e transcrição. Essa dependência pode ser observada na modulação da taxa de transcrição que ocorre em paralelo às mudanças na organização nuclear

(ELIAS *et al.*, 2001) e também durante a fase S do ciclo celular, quando os cromossomos se agrupam na periferia nuclear para que a replicação ocorra (ELIAS *et al.*, 2002). Um outro trabalho mostrou a influência da organização nuclear na transcrição de genes específicos em *T. brucei*. Nesse trabalho, os autores identificaram um corpúsculo extranucleolar contendo RNA polimerase I transcricionalmente ativa que está presente apenas nas formas sangüíneas do parasita. Os autores propõe que o recrutamento de um único sítio de expressão de VSG (variant surface glycoprotein) e a concomitante exclusão dos *loci* inativos desse corpúsculo de transcrição poderia definir o mecanismo responsável pela expressão mono-alélica das VSGs (NAVARRO & GULL, 2001).

Dentre os estudos sobre o núcleo, poucos tiveram como foco a compreensão de fenômenos relacionados à arquitetura nuclear dos tripanossomas além dos já citados anteriormente. Com o intuito de identificar proteínas em organelas isoladas, ROUT e FIELD (2001) desenvolveram uma metodologia de purificação capaz de isolar subcompartimentos nucleares em *T. brucei* para posterior caracterização. Além de estabelecer um protocolo eficiente, eles mostraram a presença de uma estrutura semelhante à lâmina nuclear (Fig. 12), que ainda não havia sido descrita em tripanossomas, e caracterizaram a proteína mais abundante nessa estrutura, a NUP-1. Entretanto, a função dessa proteína de lâmina nuclear ainda não foi estabelecida.

Ainda estamos longe do momento em que poderemos dizer que conseguimos entender o núcleo dos tripanossomas. Muito trabalho ainda deverá ser feito para que possamos compreender toda a complexidade que envolve os fenômenos relacionados à organização nuclear associados a todos os processos onde o núcleo é fundamental!

FIGURA 12 – ISOLAMENTO DE SUBCOMPARTIMENTOS NUCLEARES



Fonte: ROUT & FIELD, 2001.

Nota: A) Núcleo intacto de forma procíclica de *T. brucei*. Escala = 0,5  $\mu\text{m}$ ; B) Esquema das estruturas visíveis no núcleo; C) Fração de lâmina nuclear e complexo de poros nuclear. Notar a integridade da estrutura mesmo na ausência de membranas. Escala = 0,5  $\mu\text{m}$ .

## 2 OBJETIVOS

O *Trypanosoma cruzi* é um modelo interessante, não só por ser o agente causador da doença de Chagas, mas por apresentar características peculiares da biologia celular e molecular. No entanto, pouco se sabe sobre a arquitetura nuclear em *T. cruzi* apesar do importante papel desempenhado pelo núcleo em todos os organismos.

Com a intenção de gerar informações que auxiliem na compreensão da arquitetura nuclear em *T. cruzi*, investigamos a presença de uma proteína de lâmina nuclear ortóloga à NUP-1 de *T. brucei* e suas interações com o DNA, visto que essas interações têm o potencial de influenciar a estrutura ou a organização da cromatina.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o gene *TcNUP-1*;
- Caracterizar a proteína codificada por esse gene;
- Investigar possíveis interações dessa proteína com DNA;

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES UTILIZADOS

Os reagentes e as soluções utilizados durante a execução do trabalho prático estão descritos a seguir:

- a) **LB** – meio de cultura contendo triptona 1 %, extrato de levedura 0,5 % e NaCl 1 %. Autoclavado e mantido à temperatura ambiente.
- b) **LIT** – meio de cultura contendo de infuso de fígado 0,5 % (Difco), NaCl 75,3 mM, KCl 5,4 mM, glicose 10 mM, bacto-triptose 0,5 % (Difco), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 56,4 mM, hemina 0,0025 %, soro fetal bovino 10 % (CultLab) e extrato de levedura 15 g/l. Filtrado esterilmente e mantido a 4 °C.
- c) **Marcadores de massa molecular**
  - 1 kb Plus DNA Ladder – Invitrogen
  - $\lambda$  DNA/*Hind*III – New England Biolabs
  - 0.24-9.5 kb RNA Ladder - Invitrogen
- d) **Mix de dNTP** – dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Amersham Biosciences) foram misturados e diluídos em Tris-HCl pH 7,5 10 mM para obter uma solução estoque com concentração final de 2,5 mM de cada nucleotídeo. Mantido em congelador – 20 °C.
- e) **Oligonucleotídeos** – Qiagen
- f) **PBS** – solução tampão contendo NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM. Mantida a 4 °C.



- g) **PBST** – solução contendo PBS e Triton X-100 0,075 %.
- h) **Solução de bloqueio para imunofluorescência** – solução contendo PBS e BSA 1 % (albumina sérica bovina).
- i) **Solução de bloqueio para western blot** – solução contendo TBST e de leite em pó desnatado 5 %.
- j) **Solução de Denhardt** – Ficoll 0,02 % (tipo 400, Pharmacia), polivinilpirrolidona 0,02 % (Sigma) e BSA 0,02 % (albumina sérica bovina). Mantida em congelador – 20 °C.
- k) **Solução de hibridização de DNA** – solução contendo SSC 6 X, solução de Denhardt 5 X, SDS 0,1 % e DNA de esperma de salmão fita simples 100 µg/ml. Mantida em congelador – 20 °C.
- l) **Solução de hibridização de RNA** – solução contendo formamida 50 %, solução de Denhardt 1 X, SSC 5 X, SDS 0,5 % e DNA de esperma de salmão fita simples 50 µg/ml. Mantida em congelador – 20 °C.
- m) **Tampão de amostra para proteína** – solução contendo Tris-HCl pH 6,8 40 mM, SDS 1 %, β-mercaptoethanol 2,5 %, glicerol 6 % e azul de bromofenol 0,005 %. Mantida em congelador - 20 °C.
- n) **Tampão de eluição** – solução contendo Tris-HCl pH 8 50 mM, EDTA 10 mM e SDS 1 %.
- o) **Tampão de eluição *pull-down*** – solução contendo Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 1 M e imidazol 300 mM.
- p) **Tampão de lavagem ChIP** – solução contendo Tris-HCl pH 8 10 mM, LiCl 250 mM, deoxicolato de sódio (DOC) 0,5 %, EDTA 1 mM e NP-40 0.5 %.

- q) **Tampão de lavagem *pull-down*** – solução contendo Tris-HCl pH 8 50 mM, NaCl 100 mM, imidazol 10 mM e PMSF 1 mM.
- r) **Tampão de lise alto sal** – solução contendo tampão de lise para ChIP suplementado com NaCl 360 mM. Filtrada esterilmente e mantida a 4 °C.
- s) **Tampão de lise de bactérias** – solução contendo Tris-HCl pH 8 20 mM e NaCl 0,5 M.
- t) **Tampão de lise para ChIP** – solução contendo HEPES pH 7,5 50 mM, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, deoxicolato de sódio (DOC) 0,1 %, NP-40 1 %, PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride, Sigma) 1 mM e 1 pastilha de inibidor de proteases (COMPLETE Mini Protease inhibitor cocktail tablet, Roche).
- u) **Tampão MOPS** – solução contendo MOPS 20 mM (Sigma), acetato de sódio pH 7,5 5 mM e EDTA 2 mM. Mantida a 4 °C.
- v) **Tampão TBE** – solução contendo Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM. Mantida à temperatura ambiente.
- w) **TAU** – meio de cultura contendo NaCl 190 mM, KCl 17 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM e tampão fosfato pH 6 8 mM. Filtrado esterilmente e mantido a 4 °C.
- x) **TAU3AAG** – meio TAU suplementado com L-prolina 10 mM, glutamato sódico 50 mM, aspartato sódico 2 mM e glicose 10 mM. Filtrado esterilmente e mantido a 4 °C.
- y) **TBS** – solução contendo Tris-HCl pH 8 20 mM e NaCl 150 mM. Mantida a 4 °C.
- z) **TBST** – solução contendo TBS e Tween 20 0,05 %.
- aa) **TE** – solução contendo Tris-HCl pH 8 10 mM e EDTA 1 mM. Mantida a 4 °C.

## 3.2 PREPARO DO MATERIAL

A autoclavagem dos tubos e ponteiros foi realizada a 1 atm, por 20 minutos.

Todas as soluções acima foram filtradas em 0,45  $\mu$ , com ressalva àquelas indicadas que foram filtradas esterilmente (filtradas em 0,22  $\mu$  em fluxo laminar).

Com exceção daquelas soluções cuja manutenção foi indicada no item anterior, todas as outras foram preparadas no momento do uso.

## 3.3 PROCEDIMENTOS TÉCNICOS

### 3.3.1 CULTIVO DO PARASITA

As formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* Dm28c foram mantidas em meio LIT (do inglês: *liver infusion tryptose*) a 28 °C (CAMARGO, 1964; CONTRERAS *et al.*, 1985a).

A diferenciação das formas epimastigotas para formas tripomastigotas metacíclicas foi realizada *in vitro*, sob condições quimicamente definidas (CONTRERAS *et al.*, 1985b; BONALDO *et al.*, 1988). Resumidamente, formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas (10,000 x g por 15 min a 10 °C) e incubadas por 2 h em meio TAU (urina artificial de triatomíneo). Após esse estresse nutricional, os parasitas foram transferidos para garrafas de cultivo contendo meio TAU3AAG. Os parasitas em diferenciação se aderem à parede do frasco e são liberados no meio de cultura após 96 h como tripomastigotas metacíclicos.

### 3.3.2 EXTRAÇÃO DE DNA E RNA

DNA total foi purificado a partir de formas epimastigotas como descrito em FRAGOSO & GOLDENBERG (1992).

RNA total foi obtido a partir de formas epimastigotas de acordo com o protocolo de KARLINSEY *et al.* (1989).

### 3.3.3 CLONAGEM E SEQÜENCIAMENTO DO GENE *TcNUP-1*

Através do seqüenciamento de bibliotecas de cDNA de *Trypanosoma cruzi*, nós identificamos um fragmento que apresentou similaridade com NUP-1, uma proteína de envelope nuclear de *Trypanosoma brucei* (número de acesso no GenBank: AAX79640).

Em seguida, através de buscas no banco de dados do TIGR nós identificamos um conjunto de seqüências parciais que usamos para criar um agrupamento que continha praticamente toda a região codificante do gene *TcNUP-1*. Para obter a seqüência completa do gene, nós amplificamos e seqüenciamos os fragmentos indicados na Tabela 1.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20 µl, contendo 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador, 1 X tampão HighFidelity com  $Mg^{2+}$  (2,5 mM  $Mg^{2+}$ ), 0,3 mM mix de dNTP, 100 ng de DNA genômico de *T. cruzi* e 1.5 U TripleMaster (Eppendorf). As reações foram realizadas em um termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) com um programa contendo uma etapa de desnaturação a 93 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos a 93 °C por 30 s, 58 °C for 1 min e 68 °C for 2 min. Após eletroforese em gel de agarose para confirmar a especificidade da reação, todos os produtos de PCR foram clonados diretamente no vetor pGEM-T Easy (Promega), seguindo instruções do fabricante. Os plasmídeos recombinantes foram obtidos utilizando o kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen)

e seqüenciados em um seqüenciador automático de DNA modelo ABI 3100 (Applied Biosystems).

TABELA 1 - OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES

<i>Domínio</i>	<i>Referência</i>	<i>Seqüência dos Oligonucleotídeos</i>
Amino	F1R1	NupF1: 5' – GCGAATTCTTACCCGGGCTTCTTCACGAG – 3' NupR1: 5' – TGCAGGAGGTCTATCTGTGCTTTCT – 3'
Amino/ Repeats	F2R2	NupF2: 5' – CAGAATGAGCGCTGTCGGAATGAA – 3' NupR2: 5' – GGAGCCCCGAGCCAAGGT – 3'
Repeats	F3R3	NupF3: 5' – CCGAATTCCCATGCAGCGATTGACCAGC – 3' NupR3: 5' – CGCCGCCGCCAGTTG – 3'
Repeats/ Carboxi	F4R4	NupF4: 5' – CATGCAGCGATTGACCAGC – 3' NupR4: 5' – TCACGATGATGCGTCTATGGC – 3'
Carboxi	F5R4	NupF5: 5' – CACGTGTGGAAAACAATGATGGA – 3' NupR4: 5' – TCACGATGATGCGTCTATGGC – 3'

### 3.3.4 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

As seqüências de DNA foram analisadas utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997, disponível na página do NCBI em <http://www.ncbi.nih.gov>) e também os programas EditSeq e SeqMan do pacote de análise Lasergene (Dnastar Inc.).

As seqüências de proteínas foram analisadas utilizando o algoritmo BLAST, os programas EditSeq, MegAlign e Protean (Dnastar Inc.) e ferramentas como Prosite/Expasy (<http://www.expasy.org>). Buscas por domínios conservados na proteína foram realizadas no banco de dados de domínios conservados (CDD: Conserved Domain Database, <http://www.ncbi.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>, MARCHLER-BAUER *et al.*, 2005). A predição de estrutura coiled-coil foi realizada utilizando o método estrutura secundária – *coiled coil* (PARRY, 1982) do programa Protean adotando 1.3 como valor limite (alta

estringência). A predição de alfa-hélices não-polares transmembranas foi realizada utilizando o método Hidropatia – Goldman-Engleman-Steitz com parâmetros padrões (ENGELMAN *et al.*, 1986) do programa Protean. A predição da localização da proteína foi realizada utilizando o programa PSORTII (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>, HORTON & NAKAI, 1997).

### **3.3.5 ANÁLISE DO RNAM DO GENE *TcNUP-1***

A análise do RNAm através da técnica de northern blot foi realizada seguindo o protocolo de SAMBROOK *et al.* (1989). Dez microgramas de RNA total extraído das formas epimastigotas foram submetidos à eletroforese em gel desnaturante de agarose (1,2 %) em tampão MOPS e, em seguida, transferidos em membrana de nylon (Hybond N, Amersham Biosciences). A hibridização foi realizada em solução de hibridização de RNA a 42 °C por 16 h, utilizando 5 x 10<sup>6</sup> cpm/ml do fragmento F3R3 marcado como sonda. Esse fragmento foi marcado radioativamente com [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (Amersham Biosciences) utilizando o kit de marcação Nick Translation System (Invitrogen) e purificado através de microcoluna ProbeQuant G-50 (Amersham Biosciences). Depois da hibridização, a membrana foi lavada duas vezes em SSC 2 X; SDS 0,1 %, duas vezes em SSC 1 X; SDS 0,1 % e duas vezes em SSC 0,5 X; SDS 0,1 % a 42 °C e, então, utilizada para expor os filmes de raios-X (X-ray Hyperfilm MP, Amersham Biosciences).

### **3.3.6 ANÁLISE DAS PECULIARIDADES DO GENE**

Cinco microgramas de DNA total de *T. cruzi* foram totalmente digeridos utilizando *ApaI* + *DraI*, *BclI* e *BssHII* (New England Biolabs), Em seguida, foram submetidos à

eletroforese em gel de agarose (1 %) em tampão TBE e posteriormente transferidos para uma membrana de nylon (Hybond N, Amersham Biosciences) utilizando protocolo padrão (SAMBROOK *et al.*, 1989). A membrana foi hibridada por 16 h, a 65 °C em solução de hibridização de DNA usando  $10^6$  cpm/ml do fragmento F3R3 marcado radiativamente como descrito anteriormente (item 3.4.5). Depois da hibridização, a membrana foi lavada como descrito anteriormente (item 3.4.5) e usada para expor filmes de raios-X.

Cinco microgramas de DNA total de *T. cruzi* foram digeridos parcialmente com a enzima de restrição *SacI* (New England Biolabs) e totalmente com as enzimas *PstI* e *XcmI* (New England Biolabs). Em seguida, essas amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 % e transferidas para uma membrana de nylon (Hybond N, Amersham Biosciences). A membrana foi hibridada por 16 h, a 65 °C em solução de hibridização de DNA usando  $10^6$  cpm/ml do fragmento F3R3 marcado como descrito anteriormente (item 3.4.5). A membrana foi lavada como anteriormente (item 3.4.5) e utilizada para expor filmes de raios-X.

### **3.3.7 CLONAGEM E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE**

O produto de PCR referente à região F2R2 também foi clonado no vetor pTrcHis-TOPO (Invitrogen) e expresso em células *E. coli* TOP10F'. A produção de proteína recombinante foi induzida através da adição de IPTG 1 mM (isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside, Invitrogen) seguida de um cultivo adicional de 3 h a 37 °C. As bactérias foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em tampão de lise de bactérias e lisadas por sonicação (5 vezes por 10 segundos a 4 °C, Ultrasonic Homogenizer 4710 series, Cole-Parmer). Após centrifugação a 5.000 x g, o sedimento foi ressuspenso no mesmo tampão acima suplementado com uréia 2 M e Triton X-100 2 %, sonicado e centrifugado novamente

nas mesmas condições. Então, o sedimento foi ressuspensão em tampão de amostra para proteína e submetido à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (10 % SDS-PAGE, LAEMMLI, 1970). Após a eletroforese, o gel foi tratado com KCl 0,1 M gelado, o que permitiu a visualização e retirada da região do gel correspondente à proteína recombinante, que foi posteriormente eletroeluída e dialisada contra PBS pH 8 por 16 h à temperatura ambiente.

### **3.3.8 PRODUÇÃO DO ANTÍSSORO POLICLONAL**

Camundongos da linhagem Swiss foram imunizados através de injeções intraperitoniais utilizando 100 µg da proteína recombinante emulsificada com adjuvante de Freund completo (Sigma) na primeira inoculação e adjuvante de Freund incompleto (Sigma) nas 3 seguintes. As inoculações tiveram um intervalo de 2 semanas entre cada dose e o antissoro foi obtido 5 dias após a última inoculação.

Da mesma maneira, coelhos foram imunizados através de injeções subcutâneas utilizando 100 µg da proteína recombinante emulsificada com adjuvante de Freund completo (Sigma) na primeira inoculação e adjuvante de Freund incompleto (Sigma) nas 3 seguintes. As inoculações tiveram um intervalo de 2 semanas entre cada dose e o antissoro foi obtido 5 dias após a última inoculação.

### **3.3.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA**

Para a análise de western blot, formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* foram obtidas como descrito no item 3.3.1. Os parasitas foram coletados por centrifugação ( $4.000 \times g$ , 15 min a 10 °C), lavados duas vezes em PBS pH 7.5 e lisados em



tampão de amostra para proteína. As amostras foram normalizadas em relação à quantidade de proteína por amostra através de dosagem utilizando o MicroBCA protein assay reagent kit (Pierce). Em seguida, foram submetidas a 6 % SDS-PAGE e posteriormente transferidas por 16 h para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences) de acordo com protocolo padrão (TOWBIN, 1979). Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio para western blot por 1 h. Em seguida, a membrana foi incubada por 2 h a 37 °C com o antissoro policlonal produzido em camundongo contra a proteína recombinante (diluição 1:5.000 em solução de bloqueio para western blot). Após três lavagens em TBST, a membrana foi incubada à temperatura ambiente por 45 min com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:7.500 em solução de bloqueio para western blot. A membrana foi então lavada em tampão da fosfatase alcalina e os anticorpos ligados foram visualizados através da reação da fosfatase alcalina utilizando como substratos o BCIP (50 µg/ml) e o NBT (50 µg/ml) (Promega).

### **3.3.10 LOCALIZAÇÃO CELULAR DA PROTEÍNA**

Formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* foram obtidas como descrito no item 3.3.1. Os parasitas foram coletados por centrifugação ( $4,000 \times g$ , 15 min a 10 °C), lavados duas vezes em PBS pH 8 e depositados sobre uma lâmina de vidro previamente tratada com poli-L-lisina. Os parasitas foram então fixados com paraformaldeído 2 % em PBS pH 8, permeabilizados em PBST por 5 min à temperatura ambiente e incubados a 4 °C durante 16 h em solução de bloqueio para imunofluorescência. Após o bloqueio, os parasitas foram incubados a 37 °C por 2 h com o antissoro produzido em camundongo contra a proteína TcNUP-1 recombinante em uma diluição de 1:250 em solução de bloqueio para imunofluorescência. Depois disso, as lâminas foram lavadas em PBS pH 8. Em seguida, os

parasitas foram incubados com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à FITC (Sigma) diluído 1:400 em solução de bloqueio para imunofluorescência contendo 50 µg/ml de iodeto de propídeo (Sigma). As lâminas foram então lavadas 6 vezes em PBS pH 8 e montadas em propilgalato (Fluka). Os parasitas marcados foram visualizados através de microscopia confocal (Radiance 2100, Biorad). Como controle negativo, os parasitas foram incubados com o soro pré-imune nas mesmas condições descritas acima.

### **3.3.11 ANÁLISE DE INTERAÇÃO PROTÉICA POR ENSAIO DE *PULL-DOWN***

O fragmento F3R3 contendo três unidades de repetição foi clonado em dois vetores de expressão diferentes para a obtenção de duas proteínas recombinantes com diferentes caudas fusionadas. O vetor pTrcHis-TOPO (Invitrogen) foi utilizado para dar origem a uma proteína recombinante fusionada a uma cauda de seis histidinas (6xHis) e o vetor pGEX-3X (Amersham Biosciences) para dar origem a uma proteína recombinante fusionada à Glutathione S-transferase (GST). Ambas proteínas recombinantes foram expressas em células *E. coli* TOP10F' após a adição de IPTG 1 mM (isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside, Invitrogen) e cultivo adicional por 3 h a 37 °C. Após centrifugação (5.000 x g por 5 min), o sedimento de bactérias foi ressuspenso em tampão de lise para bactérias, sonificado 5 vezes por 10 s a 4 °C, centrifugado (10.000 x g por 15 min) e o sobrenadante foi então utilizado para os ensaios de *pull-down* de acordo com o protocolo de NGUYEN & GOODRICH (2006) com algumas modificações. Resumidamente, o extrato de *E. coli* contendo a proteína recombinante fusionada à GST foi incubado por 16 h a 4 °C com a proteína recombinante fusionada à 6xHis previamente ligada a 50 µl de resina Ni-NTA (Qiagen) de acordo com recomendações do fabricante. Como controle, o extrato contendo a proteína recombinante fusionada à proteína

GST também foi incubado somente com 50 µl de resina Ni-NTA. Em seguida, a resina foi lavada com 2,5 ml de tampão de lavagem *pull-down* e o complexo eluído com 75 µl de tampão de eluição *pull-down*. Para confirmar a identidade das proteínas eluídas, realizamos uma análise por western blot. Para tanto, as amostras (1 µl de cada eluição, em duplicata) foram submetidas a 10 % SDS-PAGE e posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences) de acordo com protocolo padrão (TOWBIN, 1979). Após a transferência, a membrana foi incubada em solução de bloqueio para western blot por 1 h. Em seguida, uma parte da membrana contendo uma alíquota de cada amostra (*pull-down* e controle) foi incubada por 1 h a 37 °C com o anti-6xHis (Amersham Biosciences, diluição 1:3.000 em solução de bloqueio para western blot) enquanto a outra parte contendo uma replicata das amostras foi incubada por 1 h a 37 °C com o anti-GST (Pharmacia Biotech, diluição 1:1.000 em solução de bloqueio para western blot). Após três lavagens em TBST, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente por 45 min com o anticorpo secundário, sendo o anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina (Promega, diluído 1:7.500 em solução de bloqueio para western blot) para a porção da membrana previamente incubada com anti-6xHis e anti-IgG de cabra conjugado à fosfatase alcalina (Sigma, diluído 1:7.500 em solução de bloqueio para western) para a porção da membrana previamente incubada com anti-GST. As membranas foram então lavadas em tampão da fosfatase alcalina e os anticorpos ligados foram visualizados através da reação da fosfatase alcalina utilizando como substratos o BCIP (50 µg/ml) e o NBT (50 µg/ml) (Promega).

### 3.3.12 ENSAIO DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA (CHIP)

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em 100 ml de LIT a 28 °C (item 3.3.1) até uma concentração de  $5 \times 10^7$  células/ml. Em seguida, essa cultura foi submetida ao *crosslink* de proteína-DNA utilizando formaldeído 1 % (Sigma) por 15 min à temperatura ambiente. A reação de ligação foi interrompida adicionando glicina para uma concentração final de 125 mM por 5 min. Os parasitas foram então centrifugados ( $6.000 \times g$  por 15 min a 10 °C), lavados uma vez com TBS gelado contendo glicina 125 mM e duas vezes apenas com TBS gelado. O precipitado contendo  $5 \times 10^8$  células foi ressuspenso em 400 µl de tampão de lise para ChIP e sonicado (microtip, power setting 4, Ultrasonic Homogenizer 4710 series, Cole-Parmer) 6 vezes por 10 s no gelo, com intervalo de 1 min no gelo entre as sonicações. As amostras foram centrifugadas duas vezes ( $13.000 \times g$  por 15 min a 4 °C) e, posteriormente, a quantidade de proteínas no sobrenadante foi dosada utilizando o MicroBCA protein assay reagent kit (Pierce). Em seguida, foi utilizado 1 mg de extrato protéico para cada experimento e 50 µl do soro produzido em coelho contra a proteína TcNUP-1 para o experimento ChIP e 50 µl de soro pré-imune para o experimento controle. Após a imunoprecipitação por 3 h a 4 °C em agitador orbital, foram adicionados 50 µl de resina de proteína-A Sepharose (Sigma) e as reações foram então incubadas por 2 h a 4 °C em agitador orbital. Em seguida, as reações foram lavadas duas vezes com 1 ml de tampão de lise para ChIP, duas vezes com 1 ml de tampão de lise alto sal, duas vezes com 1 ml de tampão de lavagem ChIP e duas vezes com TE. Então, a cromatina imunoprecipitada foi eluída duas vezes a 65 °C por 10 min sob agitação (900 rpm) com 75 µl de tampão de eluição. As amostras foram incubadas por 16 h a 65 °C para reverter a ligação proteína-DNA. Em seguida, o DNA foi purificado utilizando o

QIAquick PCR purification kit (Qiagen) e suas extremidades foram reparadas pela Klenow de acordo com protocolo padrão (SAMBROOK *et al.*, 1989).

### 3.3.13 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA DAS SEQUÊNCIAS TcNUP-1 ESPECÍFICAS

Com o intuito de obter uma biblioteca das sequências obtidas com o ensaio de ChIP contendo somente os fragmentos de DNA ligados à TcNUP-1, nós realizamos uma hibridização subtrativa utilizando o CLONTECH PCR-Select cDNA Subtraction kit (Clontech) com modificações. Resumidamente, 2  $\mu$ M do adaptador 1 e do adaptador 2R foram ligados durante a noite às sequências de DNA purificadas a partir das imunoprecipitações controle e TcNUP-1, respectivamente. Depois disso, a T4 DNA ligase foi inativada a 65 °C por 15 min. As hibridações foram realizadas em um volume final de 12  $\mu$ l contendo 1 X Hybridization Buffer (Clontech), 6  $\mu$ L do DNA controle ligado ao adaptador 1 e 3  $\mu$ L do DNA TcNUP-1 ligado ao adaptador 2R. As amostras foram desnaturadas a 100 °C e incubadas durante a noite a 68 °C. Os fragmentos especificamente ligados à TcNUP-1 foram então amplificados por PCR em um volume final de 50  $\mu$ l, contendo 10 pmol do primer 1 (Clontech), *Taq* DNA polymerase buffer (Invitrogen) 1 X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, mix dNTP 0,2 mM, 5  $\mu$ l do produto de hibridização e 2,5 U de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). As reações foram realizadas em um termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) com um programa contendo incubações de 75 °C por 5 min e 94 °C por 30 s, seguidas por 27 ciclos a 94 °C por 20 s, 53 °C por 30 s e 72 °C por 2 min. Em seguida, foi realizada uma *nested* PCR em um volume final de 50  $\mu$ l, contendo 10 pmol do primer 2R (Clontech), *Taq* DNA polymerase buffer (Invitrogen) 1 X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, mix dNTP 0,2 mM, 5  $\mu$ l do produto da 1ª PCR e 2,5 U de *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen). As reações

foram realizadas em um termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) em um programa contendo 15 ciclos a 94 °C por 20 s, 62 °C por 30 s e 72 °C por 2 min. Esse produto de PCR foi então purificado utilizando o High Pure PCR product purification kit (Roche), precipitado e ressuspenso em 10 µl de Tris-HCl pH 7,5 10 mM. A reação de clonagem utilizando 3,8 µl desse DNA purificado, Rapid ligation buffer 1 X, 10 ng de pGEM-T Easy vector (Promega) e 3 U de T4 DNA ligase foi realizada à temperatura ambiente por 1 h e então, foi usada para transformar células *E. coli* XL1-blue eletrocompetentes de acordo com protocolo padrão (SAMBROOK *et al.*, 1989). As células foram espalhadas em placas LB/Ampicilina/IPTG/X-gal, e os clones positivos foram selecionados através de triagem branco-azul. Os plasmídeos recombinantes foram obtidos com QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen) e seqüenciados em um seqüenciador automático de DNA (modelo ABI 3100, Applied Biosystems). As seqüências obtidas foram analisadas utilizando o algoritmo BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1997). Com a finalidade de localizar esses fragmentos, as seqüências obtidas foram comparadas com as seqüências publicadas do projeto genoma de *T. cruzi* (EL-SAYED *et al.*, 2005) tanto nos bancos de dados do TIGR quanto do NCBI.

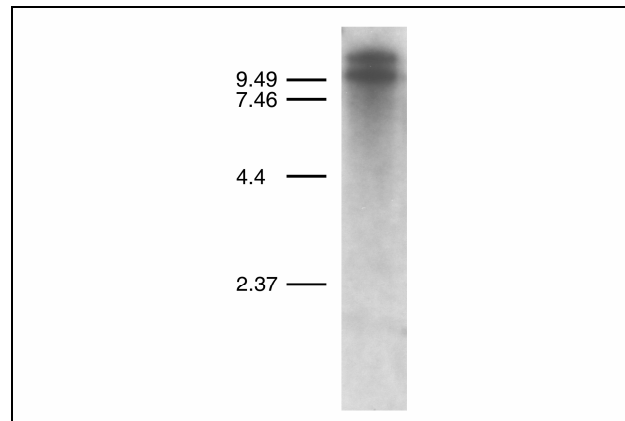
## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO GENE

Através do sequenciamento de bibliotecas de cDNA de *Trypanosoma cruzi*, nós identificamos uma sequência de DNA que apresentou similaridade com NUP-1, uma proteína de envelope nuclear de *Trypanosoma brucei* (ROUT & FIELD, 2001). Em seguida, através de buscas no banco de dados do TIGR nós identificamos um conjunto de sequências parciais que usamos para criar um agrupamento que continha praticamente toda a região codificante do gene *TcNUP-1*. As sequências obtidas a partir dessas buscas foram alinhadas para determinar a região codificante do gene *TcNUP-1*. Alguns oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados para a amplificação de fragmentos desse gene a partir do DNA genômico do *T. cruzi* Dm28c, com o intuito de confirmar a sequência obtida a partir dos bancos de dados e completar as falhas resultantes da montagem *in silico*.

Com a intenção de analisar o tamanho do RNAm transcrito, nós realizamos um ensaio do tipo northern blot onde pudemos sugerir que o gene *TcNUP-1* transcreve dois RNAm que apresentam tamanhos de 9,5 kb e 11,3 kb (Fig. 13).

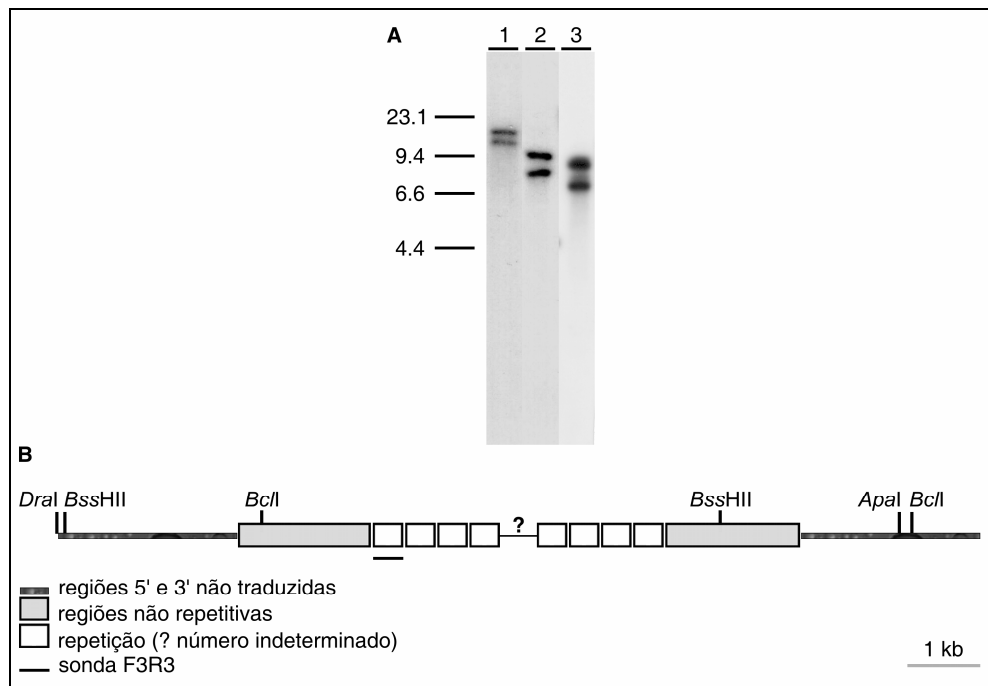
FIGURA 13 – ANÁLISE DO RNAm



Nota: Marcador de massa molecular em kb.

Com o intuito de verificar se os dois RNAm observados na análise de northern blot são codificados por um gene com cópias múltiplas ou de um gene que apresenta duas formas alélicas diferentes, nós realizamos uma análise por hibridização de Southern blot utilizando DNA total do *T. cruzi* digerido por enzimas de restrição (Fig. 14A). Foram selecionadas enzimas que apresentavam sítios de restrição em posições que flanqueiam a região onde as repetições do gene *TcNUP-1* estão contidas (Fig. 14B). Foi possível observar, a partir do perfil de hibridização, a presença de apenas duas bandas para cada uma das digestões, sugerindo que os RNAm observados no ensaio de northern blot são de fato provenientes de apenas um gene com duas formas alélicas que possuem número diferentes de repetições.



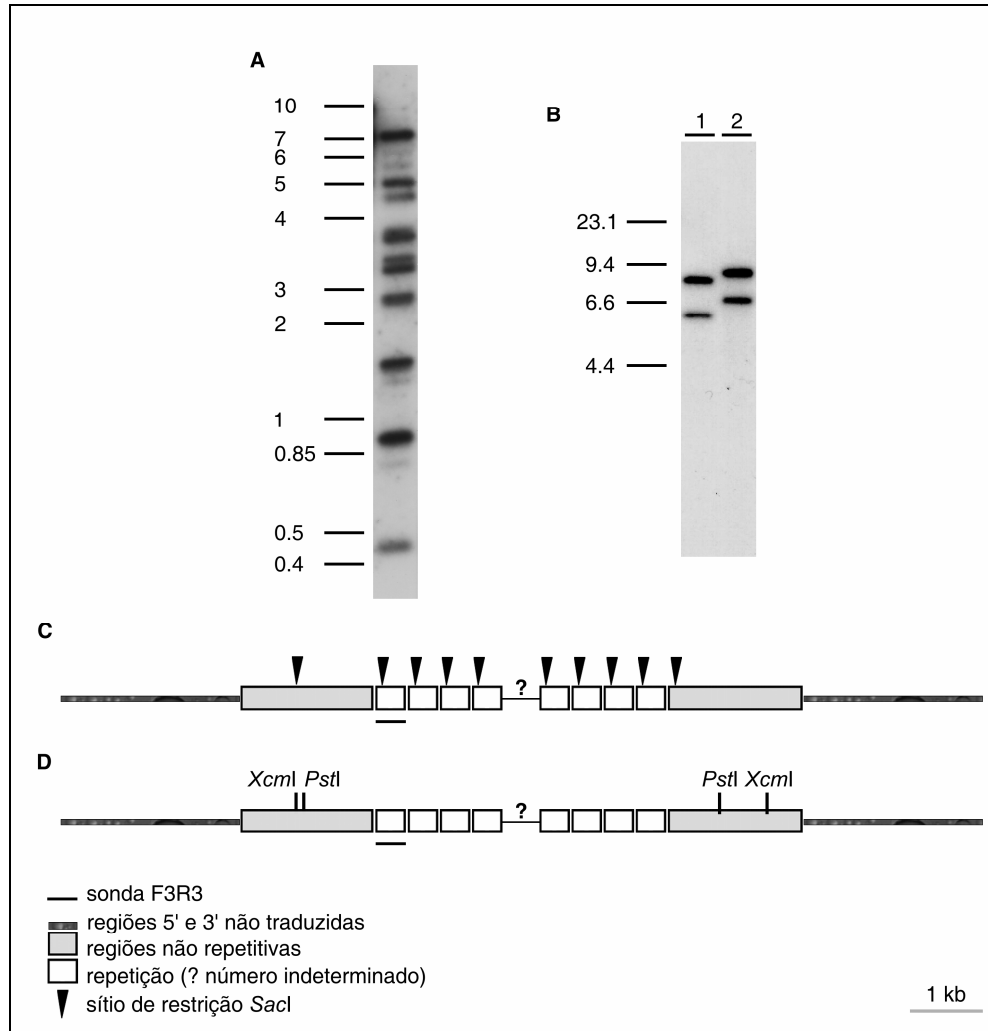
FIGURA 14 – ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DO GENE *TcNUP-1*

Legenda: A) Análise por hibridização de Southern blot da digestão total do DNA de *T. cruzi* utilizando as enzimas *ApaI* + *DraI* (1); *BclI* (2) e *BssHII* (3). B) Diagrama esquemático mostrando o mapa de restrição para *ApaI* + *DraI*, *BclI* e *BssHII*. Marcador de massa molecular em kb.

A partir dos resultados provenientes do seqüenciamento e das análises dos bancos de dados observamos que o gene *TcNUP-1* apresenta repetições de 450 pb. Entretanto, com base apenas nessas informações não foi possível determinar o número de repetições. Assim, nós realizamos uma análise por hibridização de Southern blot utilizando digestão parcial do DNA de *T. cruzi* com a enzima *SacI* que apresenta apenas um sítio de restrição em cada uma das repetições (Fig. 15A e C). A partir da análise dos resultados pudemos apenas sugerir que o gene tem mais de 9 repetições, já que a análise foi bastante dificultada devido à diferença de tamanho dos dois alelos. Para determinar o número exato de repetições em cada alelo, nós realizamos uma outra análise por Southern blot usando desta vez, digestão total do DNA com as enzimas *PstI* e *XcmI*, que possuem sítios que apenas flanqueiam a região onde as repetições estão contidas (Fig. 15B e D). Com base no tamanho dos fragmentos encontrados (todas as

repetições) e no tamanho de cada repetição (450 pb), pudemos concluir que um dos alelos possui 9 repetições enquanto o outro possui 13 repetições.

FIGURA 15 – ANÁLISE DO NÚMERO DE REPETIÇÕES



Legenda: A) Análise por hibridização de Southern blot da digestão parcial do DNA de *T. cruzi* utilizando a enzima *SacI*. B) Análise por hibridização de Southern blot da digestão total do DNA de *T. cruzi* utilizando as enzimas *PstI* (1) e *XcmI* (2). C) Diagrama esquemático mostrando o mapa de restrição para a enzima *SacI*. D) Diagrama esquemático mostrando o mapa de restrição para as enzimas *PstI* e *XcmI*.

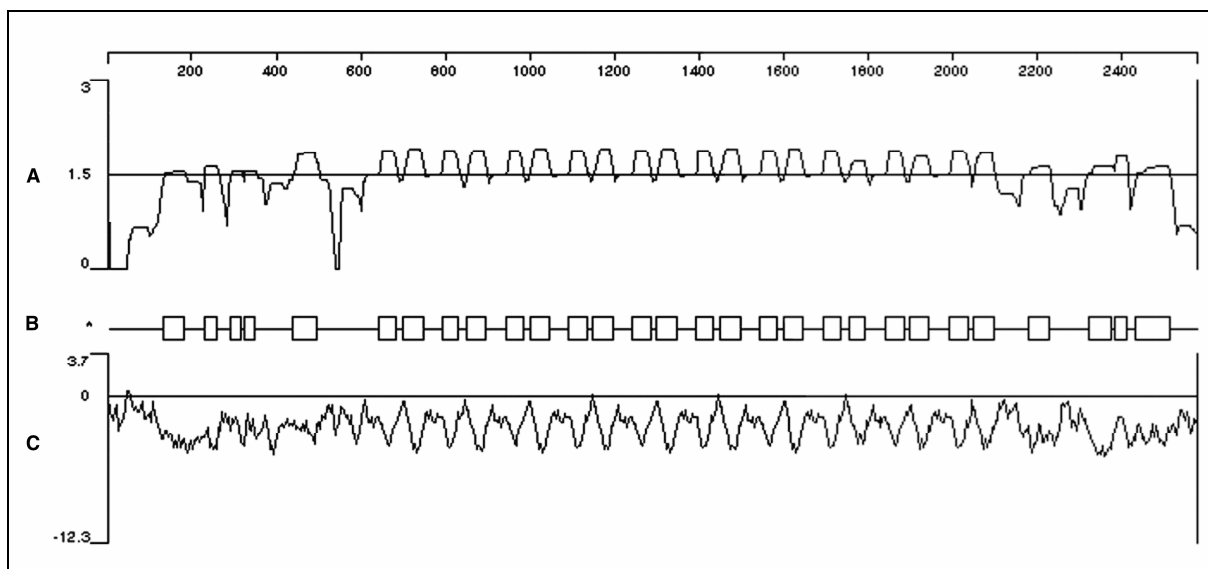
Marcador de massa molecular em kb.

## 4.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS

A proteína TcNUP-1 apresentou uma similaridade de sequência de 46 % em toda sua extensão com a proteína ortóloga NUP-1 de *T. brucei*. Além disso, buscas por similaridades de domínios conservados mostraram um valor de  $8 \times 10^{-9}$  para o domínio SMC (COG1196) e  $3 \times 10^{-6}$  para o domínio SbcC (COG0419). Esses dois domínios estão associados à atividade ATPase envolvida no metabolismo de DNA.

A análise estrutural da TcNUP-1 mostra uma proteína com domínios *coiled-coil* que não apresenta hélices transmembrana (Fig. 16). A predição realizada pelo programa PSORTII mostra TcNUP-1 como uma proteína nuclear (sinal encontrado: pat4 – KRPR) com motivos de ligação ao DNA do tipo zíper de leucina (LAEERETLARGSAELEERVREL) em cada repetição.

FIGURA 16 – PREDIÇÃO DA ESTRUTURA DA PROTEÍNA TcNUP-1

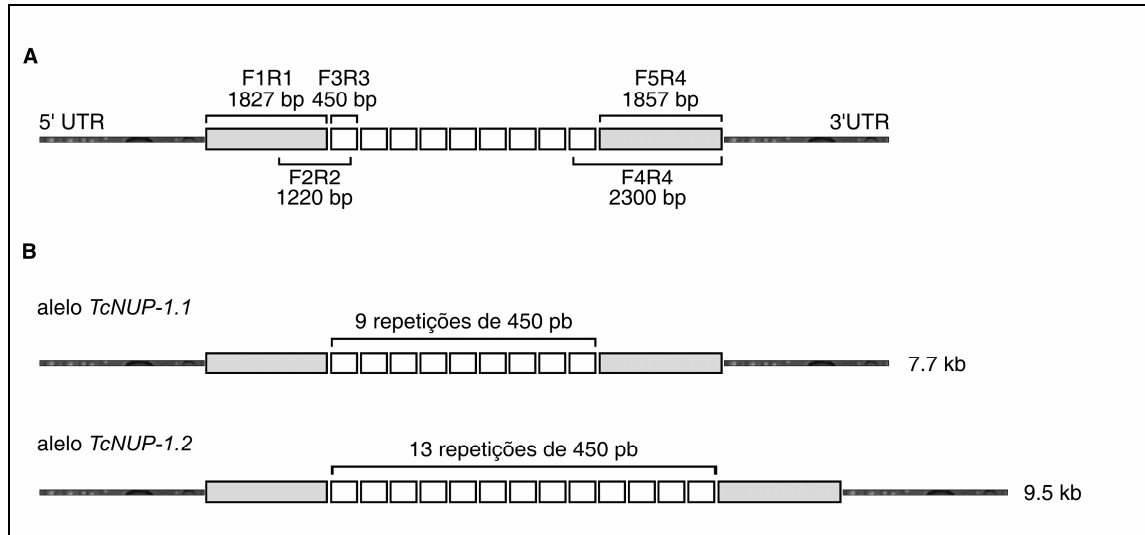


Legenda: A) Valores para estrutura em *coiled-coil*. B) Predição das regiões em *coiled-coil*. C) Predição de alfa-hélices transmembrana.

Baseados nos dados provenientes do sequenciamento e em todas as análises realizadas, nós pudemos propor um modelo esquemático da organização do gene *TcNUP-1*

(Fig. 17). Então, a sequência completa do gene *TcNUP-1* foi submetida ao GenBank sob o número de acesso AY528743.

FIGURA 17 – ESQUEMA DA ORGANIZAÇÃO DO GENE *TcNUP-1*

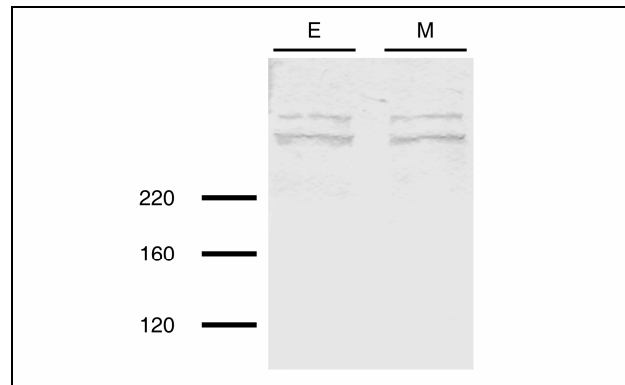


Legenda: A) Esquema das regiões do gene *TcNUP-1*. B) Características dos alelos *TcNUP-1*.

### 4.3 EXPRESSÃO DA PROTEÍNA

Uma vez que o ensaio de northern blot indicou a presença de dois RNAm com tamanhos diferentes, resolvemos investigar se isso se refletia também no tamanho das proteínas codificadas. De fato, a análise de extratos protéicos de *T. cruzi* por western blot utilizando o soro produzido contra a proteína recombinante mostrou dois polipeptídeos com massa molecular aproximada de 280 kDa e 350 kDa (Fig. 18). Esse resultado é consistente com os tamanhos esperados para as sequências de aminoácidos deduzidas a partir dos alelos *TcNUP-1.1* e *TcNUP-1.2*, respectivamente.

FIGURA 18 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO

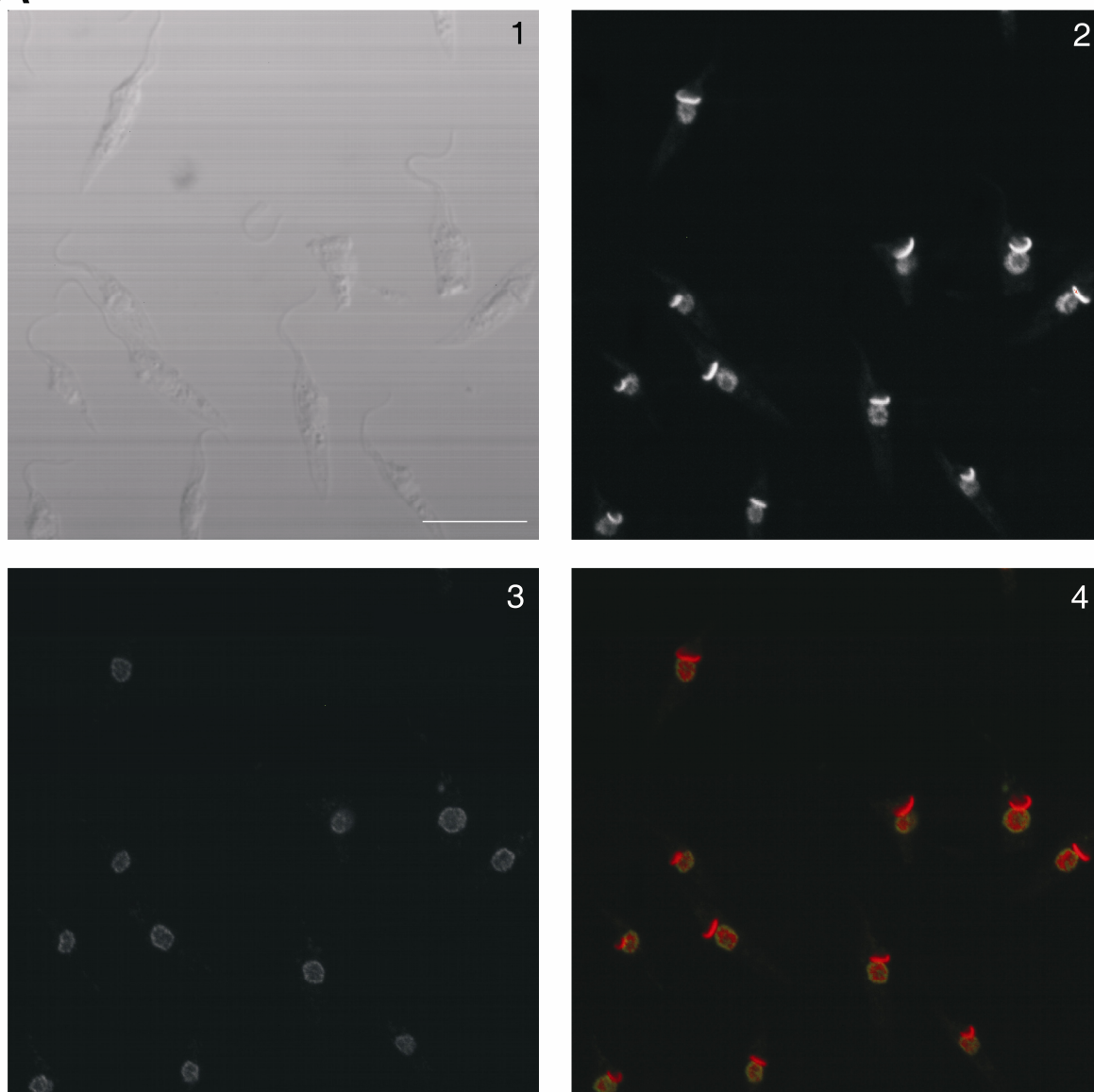


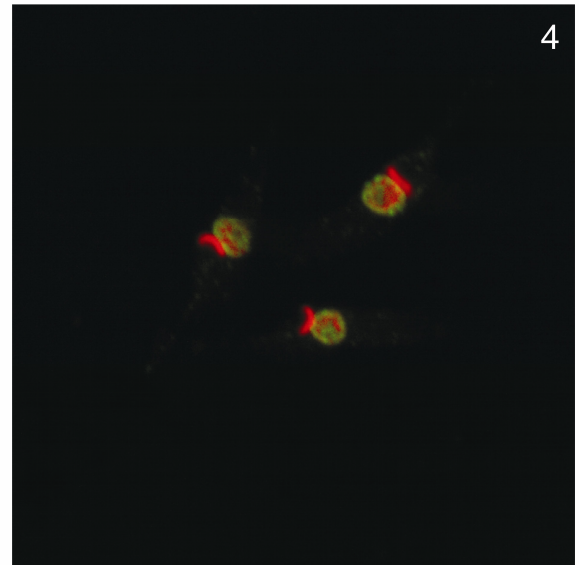
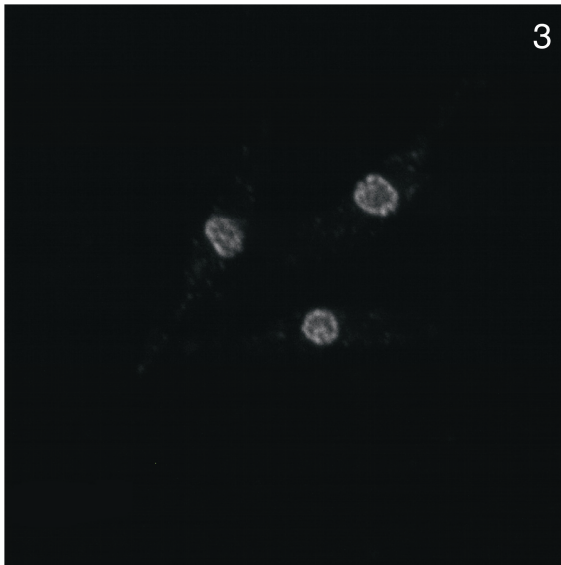
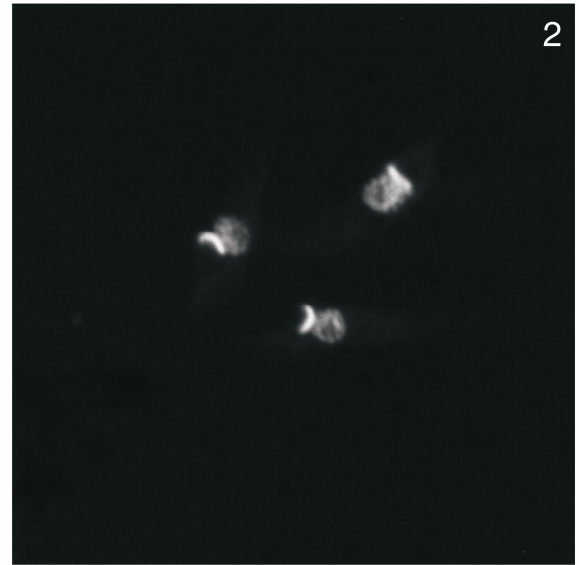
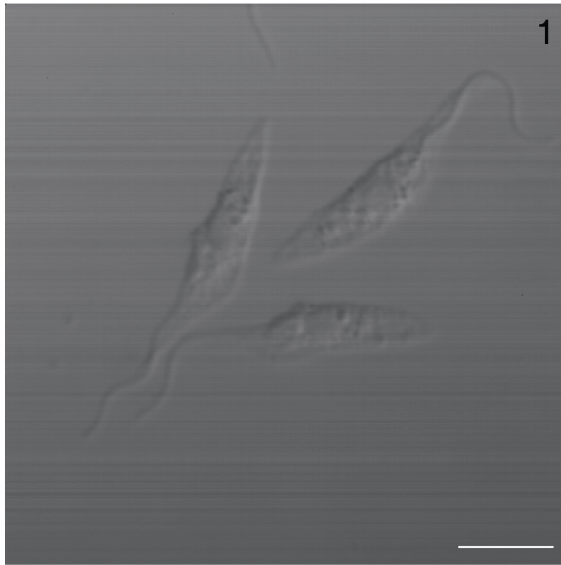
Legenda: Análise por western blot em extrato de *T. cruzi* nas formas epimastigotas (E) e tripomastigotas metacíclicas (M). Marcador de massa molecular em kDa.

Observações feitas a partir da localização da proteína NUP-1 de *T. brucei* mostraram que essa proteína se localiza na periferia do núcleo do parasita e sugerem que seja um componente importante de sua lâmina nuclear (ROUT & FIELD, 2001). Portanto, resolvemos investigar se a proteína ortóloga em *T. cruzi* (TcNUP-1) também apresenta a mesma localização celular, já que as análises de sequência mostraram que essas proteínas têm uma similaridade de apenas 46 %. A análise por microscopia confocal mostrou que TcNUP-1 é exclusivamente nuclear e que, além disso, apresenta um padrão perinuclear (Fig. 19) similar ao observado para a NUP-1 em *T. brucei*.

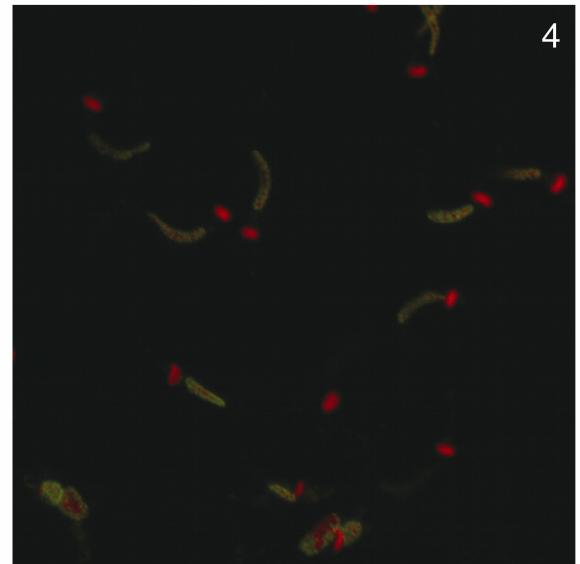
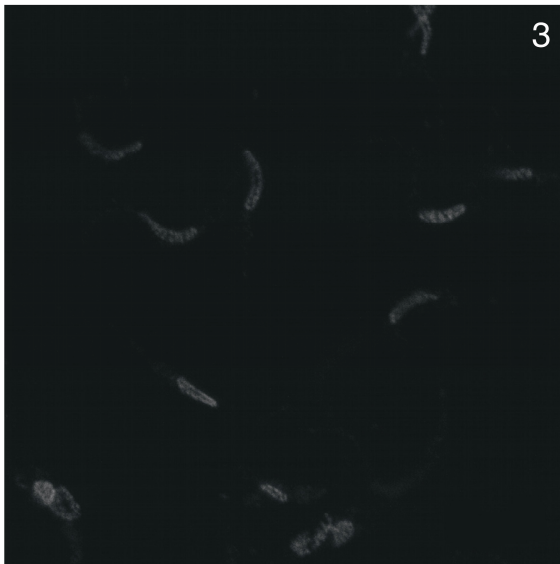
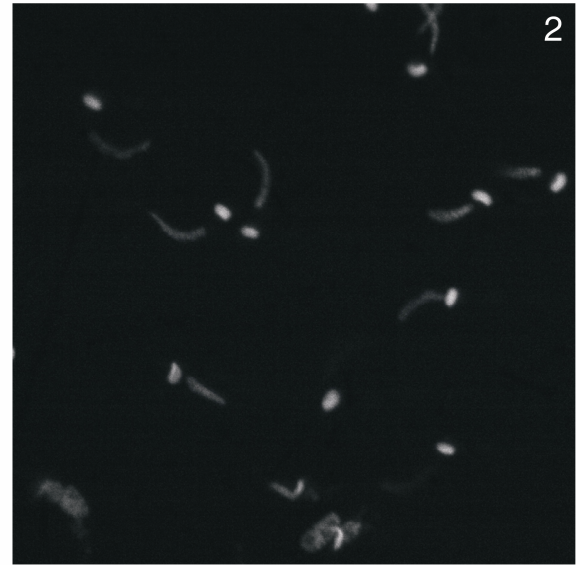
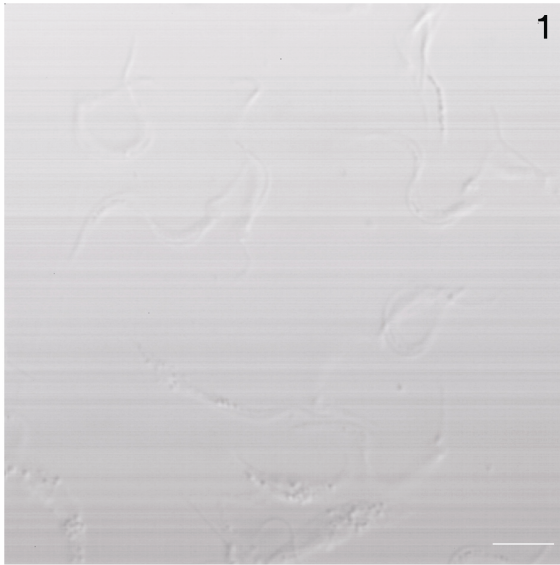
FIGURA 19 – LOCALIZAÇÃO CELULAR DA TcNUP-1

A



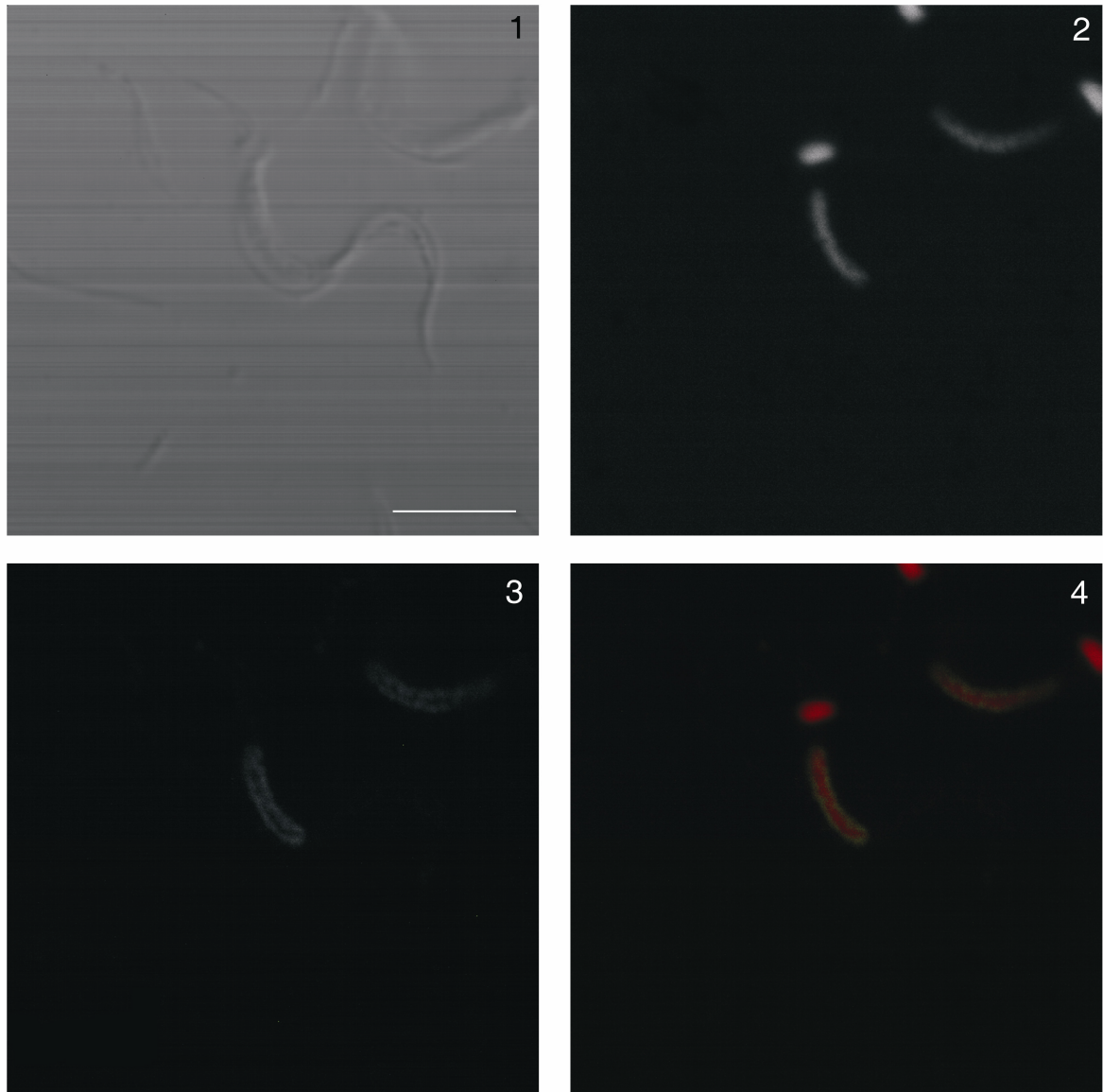
**B**

C





D



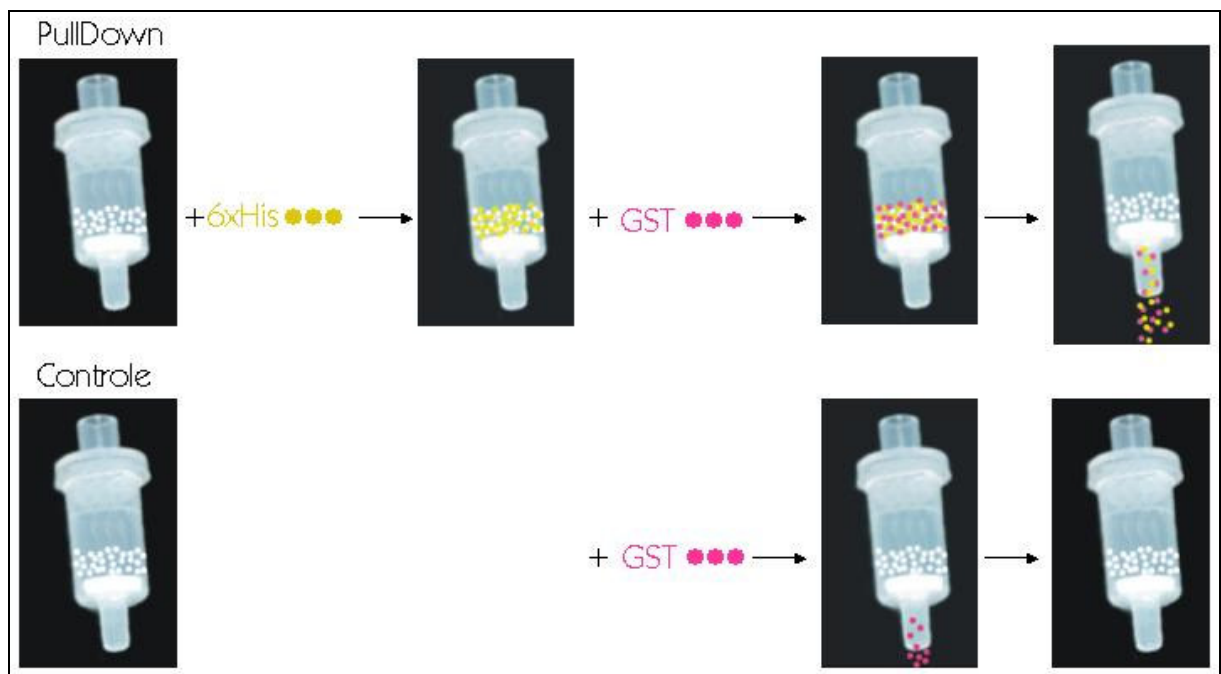
Legenda: A) Formas epimastigotas. Barra de escala: 10  $\mu\text{m}$ . B) Formas epimastigotas. Barra de escala: 5  $\mu\text{m}$ . C) e D) Formas tripomastigotas metacíclicas. Barra de escala: 5  $\mu\text{m}$ . Microscopia de contraste de interferência (1), marcação com iodeto de propídeo (2), marcação da TcNUP-1 (3) e sobreposição das imagens 2 e 3 (4).

#### 4.4 INTERAÇÃO ENTRE AS REPETIÇÕES

Devido à presença de  $\alpha$ -hélices formando estruturas em *coiled-coil* e de motivos zíper de leucina em cada repetição, nós decidimos verificar se existem interações entre as

repetições, visto que ocorre dimerização na região em *coiled-coil* dos filamentos intermediários. Nós realizamos o ensaio de *pull-down* utilizando uma região contendo três unidades de repetições fusionadas, em seu amino-terminal, a duas etiquetas diferentes, GST e 6xHis. Para tanto, a proteína recombinante fusionada à etiqueta de 6xHis foi ligada à coluna de Ni-NTA e incubada com extrato bacteriano contendo a proteína fusionada à GST. Havendo interação entre as duas proteínas, ambas seriam eluídas como complexos e identificadas por western blot usando soros anti-6xHis e anti-GST (Fig. 20).

FIGURA 20 - ANÁLISE DE INTERAÇÃO ATRAVÉS DE ENSAIO TIPO *PULL-DOWN*

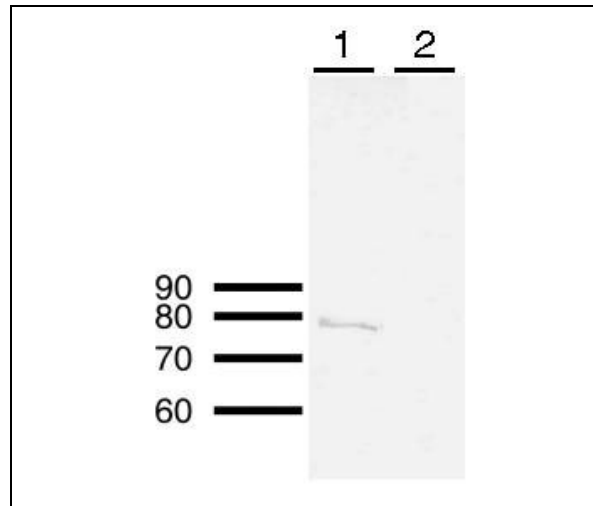


Legenda: Os círculos brancos representam a resina Ni-NTA, os círculos amarelos representam a proteína recombinante fusionada à cauda de histidina, e os círculos vermelhos representam a proteína recombinante fusionada à proteína GST.

De fato, através da análise por western blot utilizando anticorpo contra a proteína GST pudemos observar que existe interação entre as repetições já que as duas proteínas recombinantes foram eluídas em associação no experimento de *pull-down*. Além disso, não observamos nenhuma ligação da proteína fusionada à GST com a resina de níquel, mostrando

que não houve interação inespecífica entre a proteína recombinante fusionada à GST e a interação entre as repetições é específica (Fig. 21).

FIGURA 21 - ANÁLISE DA INTERAÇÃO



Legenda: Western blot utilizando soro anti-GST. (1) material eluído do experimento de *pull-down*. (2) material eluído do experimento controle. Marcador de massa molecular em kDa.

#### 4.5 INTERAÇÃO COM CROMATINA

Com base nos resultados obtidos para a localização celular da TcNUP-1 e nos dados de predição sobre a presença de motivos de ligação ao DNA, nós decidimos confirmar se a proteína se liga ao DNA e investigar os seus sítios de ligação utilizando ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP). Os fragmentos obtidos a partir da imunoprecipitação de cromatina foram clonados, levando à construção de uma biblioteca genômica de seqüências nas quais a TcNUP-1 está ligada.

A partir dessa biblioteca, 21 clones foram isolados e seqüenciados revelando diversos *loci* genômicos quando comparados às seqüências depositadas nos bancos de dados TIGR e NCBI (Tabela 2, Anexo A). Com isso, foi possível sugerir uma localização para os

fragmentos obtidos a partir da imunoprecipitação de cromatina através da identificação das regiões cromossômicas adjacentes. As análises mostraram que quase todas as seqüências encontradas associadas à proteína TcNUP-1 estavam próximas a genes e pseudogenes que codificam proteínas de superfície, retrotransposons e seqüências relacionadas à SIRE (do inglês: *short interspersed repetitive element*).

TABELA 2 – SEQUÊNCIAS OBTIDAS A PARTIR DA IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA COM TcNUP-1

<i>ChIP</i>	<i>TIGR</i>	<i>Valor de e</i>	<i>Sequências encontradas na mesma região cromossômica</i>
1	t_cruzilchr_0l1047053511323l8661	$2.5e^{-106}$	Trans-sialidase e proteínas hipotéticas
2	t_cruzilchr_0l1047053510791l8500	$9.3e^{-112}$	Mucina, retrotransposon não-LTR, genes desconhecidos e proteínas hipotéticas
5	t_cruzilchr_0l1047053511705l8760	$1.3e^{-235}$	Peudogene sialidase-like, receptor tipo adenilato ciclase e proteína de elongação de cadeias longas de ácidos graxos
6	t_cruzilchr_0l1047053508873l7909	$6e^{-101}$	Retrotransposon não-LTR, trans-sialidase, mucina-like e gp85
8	t_cruzilchr_0l1047053506001l6771	$1.9e^{-100}$	Trans-sialidase, mucina-like, gp85-like e genes desconhecidos
9	t_cruzilchr_0l1047053510371l8374	0	Trans-sialidase, mucina, proteína de superfície associada a mucina, mucina-like, gp85-like e genes desconhecidos
10	t_cruzilchr_0l1047053509011l7963	$4.1e^{-219}$	UDP-Gal ou glycosiltransferase UDP-GlcNAc-dependente, RNA polymerase IIA subunidade maior e proteínas hipotéticas
11	t_cruzilchr_0l1047053509109l8002	$3.8e^{-256}$	Proteínas hipotéticas e proteína carreadora mitocondrial
12	t_cruzilchr_0l1047053507609l7401	$4.9e^{-118}$	Retrotransposon L1Tcg62, mucina-like, gp85-like, genes desconhecidos e proteínas hipotéticas
14	t_cruzilchr_0l1047053511849l6212	$2e^{-236}$	Protease de superfície gp63, proteína de superfície associada à mucina, mucina-like e proteína de superfície c71
15	t_cruzilchr_0l1047053503421l4569	$2.1e^{-172}$	Regiões teloméricas e retrotransposon hot spot protein
16	t_cruzilchr_0l1047053509733l8185	$3.7e^{-226}$	Proteínas hipotéticas e fator de elongação da tradução 1-beta
17	t_cruzilchr_0l1047053510371l8374	$3.7e^{-192}$	Trans-sialidase, mucina, proteína de superfície associada à mucina, mucina-like, gp85-like, genes desconhecidos

<i>ChIP</i>	<i>TIGR</i>	<i>Valor de e (TIGR)</i>	<i>Seqüências encontradas na mesma região cromossômica</i>
18	t_cruzilchr_0l1047053457101l22036	$3.5e^{-178}$	Proteínas hipotéticas, cadeia pesada citosólica da dineína e proteína E de resistência a drogas
23	t_cruzilchr_0l1047053507501l7361	$8.1e^{-293}$	Proteínas hipotéticas, mucina-like, gp85-like, genes desconhecidos e retrotransposon hot spot protein
24	t_cruzilchr_0l1047053510361l8371	$4e^{-180}$	Trans-sialidase, protease de superfície gp63, mucina-like, gp85-like e genes desconhecidos
28	t_cruzilchr_0l1047053509207l8037	0	Proteínas hipotéticas, cinesina e subunidade 1 ATPase regulatória do proteassomo
34	t_cruzilchr_0l1047053508873l7909	$9.1e^{-65}$	Retrotransposon não-LTR, trans-sialidase, mucina-like e gp85
58	t_cruzilchr_0l1047053508367l7701	$6e^{-85}$	UDP-Gal ou glicosiltransferase UDP-GlcNAc-dependente, retrotransposon L1Tcg62, gp-85, mucina-like, gp85-like, genes desconhecidos e seqüências repetitivas SIRE
67	t_cruzilchr_0l1047053511491l8707	0	Proteínas hipotéticas, proteína KU80 e cinesina
90	t_cruzilchr_0l1047053508521l7761	$6.7e^{-167}$	Trans-sialidase, protease de superfície gp63, betagalactofuranosil glicosiltransferase e região telomérica

Nota: As seqüências obtidas a partir da imunoprecipitação de cromatina foram comparadas às seqüências disponíveis nos bancos de dados do TIGR. As seqüências que apresentaram maior similaridade e menor valor de *e* para cada clone foram então comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados do NCBI, possibilitando uma sugestão de localização cromossômica através da identificação de genes adjacentes.

## 5 DISCUSSÃO

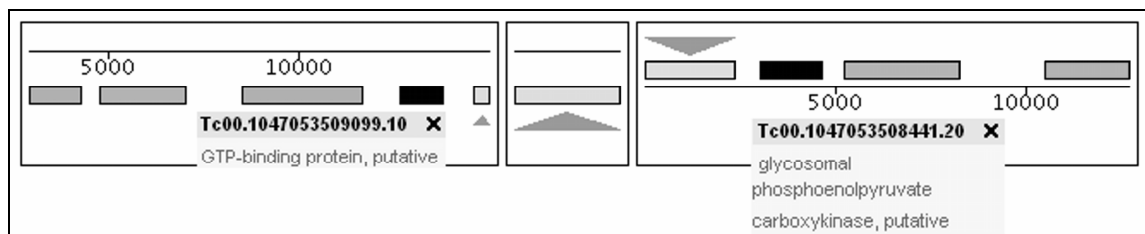
O *Trypanosoma cruzi*, parasita protozoário responsável pela doença de Chagas, pertence a um grupo que divergiu muito cedo na linhagem eucariótica, apresentando diversas características únicas tanto em relação à biologia celular quanto à molecular. Apesar de existirem alguns trabalhos que estudam o núcleo (BELLI, 2000; de SOUZA, 2002) e a organização nuclear em *T. cruzi* (ELIAS *et al.*, 2001, 2002), o conhecimento ainda é limitado. Esse trabalho identificou uma provável proteína de lâmina nuclear em *T. cruzi* contribuindo com a caracterização da estrutura e da organização nuclear nesse parasita. Além disso, nossas análises forneceram ferramentas que nos auxiliaram a sugerir uma das funções de uma proteína de lâmina nuclear em tripanossomatídeos.

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO GENE

De acordo com os resultados obtidos a partir das análises de hibridização de Southern blot e de seqüenciamento, os dados obtidos na análise dos bancos de dados também sugerem que *TcNUP-1* é um gene de cópia única que apresenta duas formas alélicas diferentes. Analisando as seqüências obtidas para busca de *NUP-1* no banco de dados de seqüências de *Trypanosoma cruzi* (<http://www.genedb.org/genedb/tcruzi>) nós encontramos três entradas diferentes para *NUP-1* (Tc00.1047053508441.10, Tc00.1047053511617.9 e Tc00.1047053509099.5). Entretanto, uma análise detalhada mostrou que apesar de diferentes, essas seqüências não representavam diferentes regiões do genoma, mas segmentos diferentes e não-sobrepostos do gene (Fig. 22). A primeira (Tc00.1047053509099.5) e a terceira (Tc00.1047053508441.10) entradas representam, respectivamente, os segmentos final e

inicial do gene e mostram que o gene *TcNUP-1* é flanqueado por genes que codificam uma fosfoenolpiruvato carboxiquinase glicossomal putativa e uma proteína putativa de ligação à GTP. A segunda entrada não mostra genes vizinhos porque é um segmento interno do gene. Dessa maneira, nós sugerimos que *TcNUP-1* é um gene de cópia única que possui dois alelos com tamanhos diferentes, e que essa diferença de tamanho é devido somente à diferença no número de repetições, originada provavelmente por recombinação homóloga.

FIGURA 22 – ORGANIZAÇÃO GENÔMICA NO GeneDB



Legenda: As caixas cinza claro marcadas por uma seta representam os fragmentos do gene *TcNUP-1*. As caixas pretas indicam os genes flanqueadores.

## 5.2 CARACTERÍSTICAS DA PROTEÍNA

TcNUP-1 é uma proteína de alta massa molecular (280 e 350 kDa, aproximadamente) que apresenta estrutura em *coiled-coil*. Está presente na periferia nuclear como também descrito para NUP-1 de *T. brucei* (ROUT & FIELD, 2001). Os domínios em *coiled-coil* são motivos de oligomerização e consistem de duas ou mais alfa-hélices que se entrelaçam para formar uma superhélice (BURKHARD *et al.*, 2001). Domínios em *coiled-coil* são ideais para associação, e é provável que proteínas diferentes contendo esse tipo de estrutura tenham sido recrutadas para funções nucleoesqueléticas em diversas ocasiões durante a evolução dos eucariotos (BURKHARD *et al.*, 2001; MANS *et al.*, 2004). Muitas proteínas com domínios *coiled-coil* estão envolvidas em interações proteína-proteína através de homodimerização ou heterodimerização desses domínios (BURKHARD *et al.*, 2001) e são



encontradas envolvidas na estruturação de uma ampla variedade de processos celulares, como proteínas de citoesqueleto (microtúbulos, actina e filamentos intermediários), proteínas motoras (miosina, cinesina e dineína) e diversos fatores de transcrição. Através de ensaio de *pull-down* utilizando um fragmento da proteína (três repetições), nós mostramos que, ao menos *in vitro*, existe interação entre os domínios *coiled-coil* das repetições. Essas observações aliadas ao fato da proteína se localizar preferencialmente na periferia nuclear e estar presente tanto em formas replicativas quanto em formas infectivas sugerem um papel para TcNUP-1 como uma proteína estrutural.

### 5.3 INTERAÇÃO COM CROMATINA

A lâmina nuclear apresenta um papel fundamental na organização do núcleo por ancorar a cromatina ao envelope nuclear (GRUENBAUM *et al.*, 2000; HUTCHISON, 2002; D'ANGELO & HETZER, 2006). Supondo que TcNUP-1 é uma proteína de lâmina nuclear assim como sua ortóloga em *T. brucei*, nós iniciamos uma busca por evidências para associações com DNA, visto que esse tipo de interação foi observado para as laminas (GRUENBAUM *et al.*, 2003). Análises *in silico* mostraram motivos de ligação ao DNA nas repetições, corroborando a hipótese de que TcNUP-1 apresenta um papel estrutural. Muitas proteínas nucleares com função estrutural agem através da interação com regiões específicas do genoma, como os complexos protéicos condensina (WANG *et al.*, 2005) e coesina (GLYNN *et al.*, 2004; CHANG *et al.*, 2005), topoisomerase do tipo II (BORDE & DUGUET, 1998) e proteínas de arcabouço nuclear (von KRIES *et al.*, 1991; BOHM *et al.*, 2005). Para confirmar essa hipótese, nós geramos mapas dos sítios de interação da TcNUP-1 utilizando imunoprecipitação de cromatina, uma técnica que se baseia na ligação *in vivo* dos complexos proteína-DNA (LÓDEN & van STEENSEL, 2005). Associações *in vivo* entre ácidos

nucléicos e laminas foram observadas em experimentos de foto-*crosslinking* em *Drosophila* (RZEPECKI *et al.*, 1998), entretanto, a definição dos alvos dessa interação foi realizada somente *in vitro* e mostrou que as laminas se ligam a seqüências MAR (regiões de interação à matriz, LUDÉRUS *et al.*, 1994) e também a seqüências centroméricas e teloméricas (SHOEMAN & TRAUB, 1990; BARICHEVA *et al.*, 1996). Dessa maneira, nosso trabalho foi o primeiro a identificar alvos *in vivo* para uma proteína de lâmina nuclear. Nós encontramos associação com seqüências de DNA que contém genes e pseudogenes da família das trans-sialidades, membros da família gênica da proteína *gp85* e seqüências relacionadas à SIRE, sendo que essas seqüências são comumente encontradas associadas às regiões subteloméricas dos cromossomos do *T. cruzi* (CHIURILLO *et al.*, 1999; KIM *et al.*, 2005). Essas observações estão de acordo com trabalhos anteriores que sugerem que regiões teloméricas e subteloméricas estão ancoradas na periferia do núcleo (CRAIG, 2004). Análises tridimensionais em núcleos interfásicos de *Drosophila* mostraram que regiões que possuem cromatina mais condensada como centrômeros e telômeros estão fortemente associadas à lâmina nuclear (MARSHALL & SEDAT, 1999). Além disso, associações entre o envelope nuclear e telômeros também já foram mostradas em levedura (GOTTA *et al.*, 1996; HEDIGER *et al.*, 2002a, b; TADDEI *et al.*, 2004; BYSTRICKY *et al.*, 2005), *Plasmodium* (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2000; FIGUEIREDO *et al.*, 2002), plantas e camundongos (revisto por GRUENBAUM *et al.*, 2003; MATTOUT-DRUBEZKI & GRUENBAUM, 2003). A maioria dos estudos *in vivo* teve como base somente a análise da posição de um *locus* fluorescente. O nosso estudo, por outro lado, mostrou uma visão mais molecular do processo, encontrando *loci* alvos da proteína de lâmina nuclear TcNUP-1.

## 5.4 MAIS QUESTÕES, NOVAS DIREÇÕES

Como consequência desse estudo, novas questões são agora levantadas. Todas essas questões são baseadas no fato de que interações proteína-DNA são a base de todos os níveis de organização da cromatina (LAMOND & EARNSHAW, 1998; DUNDR & MISTELI, 2001). Novas funções para as proteínas de lâmina nuclear podem ser propostas com mais facilidade em organismos que apresentam mitose fechada, já que sua presença não estaria associada à reformação do envelope nuclear.

TcNUP-1 está localizada no envelope nuclear, porém não é uma proteína de membrana. Existe uma proteína acessória que se liga à TcNUP-1 e que a ancora na membrana? Existem outras proteínas envolvidas na interação com o DNA? A TcNUP-1 poderia formar uma rede ao longo da lâmina nuclear fornecendo uma infraestrutura para a montagem e distribuição de complexos multiprotéicos envolvidos na organização da cromatina ou também em outros processos nucleares? Dessa forma, parece absolutamente necessário um estudo sistemático das proteínas que interagem com a TcNUP-1 utilizando combinações de tecnologias de proteômica e métodos genéticos, como ensaios de duplo híbrido.

A imunoprecipitação de cromatina em formas tripomastigotas metacíclicas mostraria outros sítios de ligação para TcNUP-1? Isso pode ser um ponto interessante, já que essas formas infectivas e não replicativas apresentam um grau aumentado de condensação da cromatina.

A TcNUP-1 poderia estar envolvida no controle da expressão gênica? Apesar de ser muito mais comumente associada à inativação gênica, a ancoragem de cromatina na periferia nuclear também pode estar relacionada à ativação gênica (LODÉN & van STEENSEL, 2005;

MISTELI, 2005) como o papel recentemente sugerido para os NPCs em proteger a cromatina da repressão transcricional (CASOLARI *et al.*, 2004; MENON *et al.*, 2005).

TcNUP-1 poderia ser importante para a troca e expressão de variantes de gp85? Em *Plasmodium falciparum* (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2000) e *Trypanosoma brucei* (CHUNG *et al.*, 1990) o agrupamento dos telômeros na periferia nuclear está claramente associado à troca e à geração de novas variantes de antígenos de superfície para escapar do sistema imune do hospedeiro (CANO, 2001; BARRY *et al.*, 2003; TADDEI *et al.*, 2004).

Além disso, TcNUP-1 poderia estar envolvida em diversos processos nucleares? Existem boas evidências que as laminas estão envolvidas em funções celulares importantes que envolvem funções metabólicas e papéis fundamentais na arquitetura do núcleo (GOLDMAN *et al.*, 2005). Apesar do papel exato das laminas ainda não ter sido estabelecido, alguns trabalhos mostram que elas participam da transcrição (SPANN *et al.*, 2002) da replicação de DNA (GOLDMAN *et al.*, 1992; BRIDGER *et al.*, 1993; HUTCHISON *et al.*, 1994; HOZÁK *et al.*, 1995; BROERS *et al.*, 1999), como sugerido pela co-localização das laminas tanto com o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) como com sítios de incorporação de bromodeoxiuridina (MOIR *et al.*, 1994).





A compreensão de todos os papéis assumidos pelas proteínas de lâmina nuclear poderá trazer pistas sobre os princípios moleculares que definem a organização espacial da cromatina e a arquitetura nuclear de maneira geral.

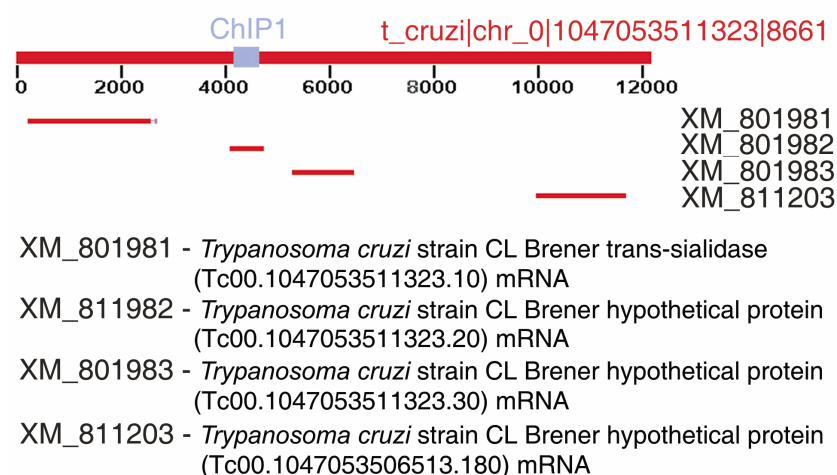
## 6 CONCLUSÕES

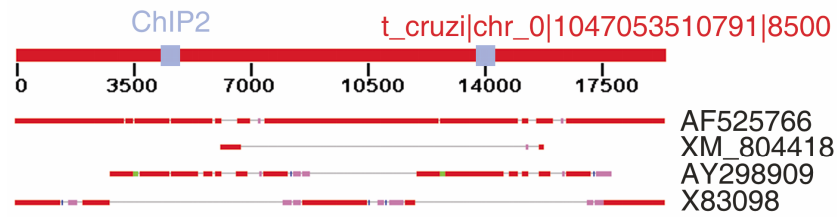
Com base nos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

1. *TcNUP-1* é um gene de cópia única que apresenta dois alelos de tamanhos diferentes, um com 7,7 kb e o outro com 9,5 kb. Essa diferença de tamanho é devido a diferença no número de unidades de repetição, sendo que um dos alelos possui 9 repetições e o outro possui 13.
2. Cada um dos alelos codifica para uma proteína com alta massa molecular com 284 kDa e 350 kDa. TcNUP-1 é uma proteína com domínios em *coiled-coil* localizada na periferia nuclear que está presente tanto nas formas epimastigotas quanto nas formas tripomastigotas metacíclicas.
3. TcNUP-1 se liga ao DNA das regiões subteloméricas dos cromossomos.
4. Finalmente, sugerimos que TcNUP-1 é uma proteína estrutural responsável por ancorar as regiões teloméricas e subteloméricas dos cromossomos ao envelope nuclear e que, portanto, pode apresentar um papel essencial na organização nuclear do *T. cruzi*.

## ANEXO A – RESULTADOS DAS ANÁLISES DOS DADOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA

Esse anexo apresenta as figuras provenientes das análises realizadas com as seqüências obtidas a partir da imunoprecipitação de cromatina. De maneira resumida, essas seqüências (representadas por  ou ) foram comparadas às seqüências disponíveis no banco de dados do TIGR. Em seguida, as seqüências que apresentaram maior similaridade e menor valor de  $e$  (representadas pelas barras vermelhas mais largas identificadas com seu respectivo número no banco de dados  **t\_cruzi|chr\_0|104**, tamanho em pares de base) para cada clone, foram comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados do NCBI (representadas pelas barras mais estreitas  identificadas com seu número de acesso). Logo abaixo da figura, está a identificação das seqüências anotadas encontradas no banco de dados do NCBI.



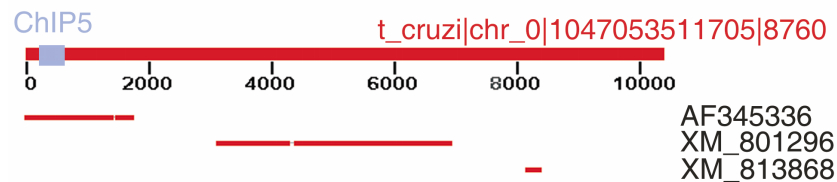


AF525766 - *Trypanosoma cruzi* unknown genes

XM\_804418 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener mucin TcMUCII (Tc00.1047053510791.20) mRNA

AY298909 - *Trypanosoma cruzi* cosmid C2 mucin-like protein and gp85-like protein (gp-85) genes; and unknown genes

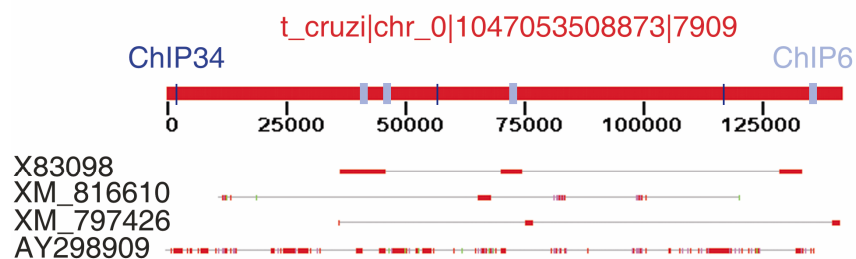
X83098 - *Trypanosoma cruzi* mRNA for Non-LTR retrotransposon



AF345336 - *Trypanosoma cruzi* sialidase-like pseudogene; co-chaperone protein (DnaJ-like) gene, and small G-protein (Rab1) gene

XM\_801296 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener receptor-type adenylate cyclase (Tc00.1047053511705.10) mRNA

XM\_813868 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener elongation of very long chain fatty acids protein (Tc00.1047053506717.10)

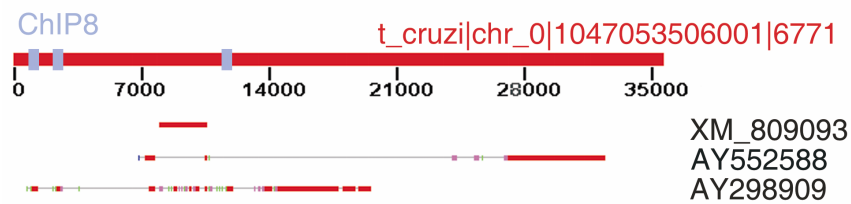


X83098 - *Trypanosoma cruzi* mRNA for Non-LTR retrotransposon

XM\_816610 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener trans-sialidase (Tc00.1047053508873.60) mRNA

XM\_797426 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener retrotransposon hot spot (RHS) protein (Tc00.1047053510845.10) mRNA

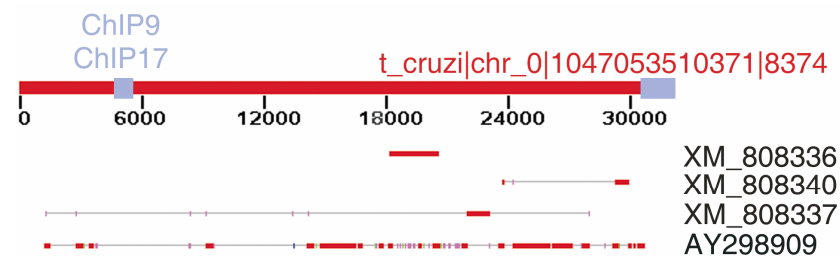
AY298909 - *Trypanosoma cruzi* cosmid C2 mucin-like protein and gp85-like protein (gp-85) genes; and unknown genes



XM\_809093 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener trans-sialidase (Tc00.1047053506001.40) partial mRNA

AY552588 - *Trypanosoma cruzi* clone C6:24B7 telomeric region

AY298909 - *Trypanosoma cruzi* cosmid C2 mucin-like protein and gp85-like protein (gp-85) genes; and unknown genes

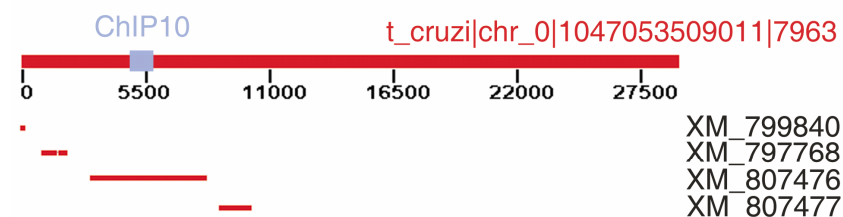


XM\_808336 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener trans-sialidase (Tc00.1047053510371.90) partial mRNA

XM\_808340 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener mucin TcMUCII (Tc00.1047053510371.130) partial mRNA

XM\_808337 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener mucin-associated surface protein (MASP) (Tc00.1047053510371.100)

AY298909 - *Trypanosoma cruzi* cosmid C2 mucin-like protein, gp85-like protein (gp-85) genes; and unknown genes



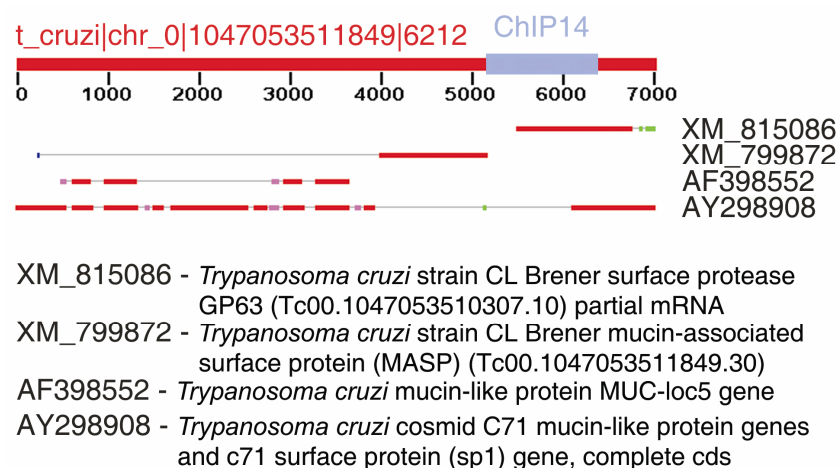
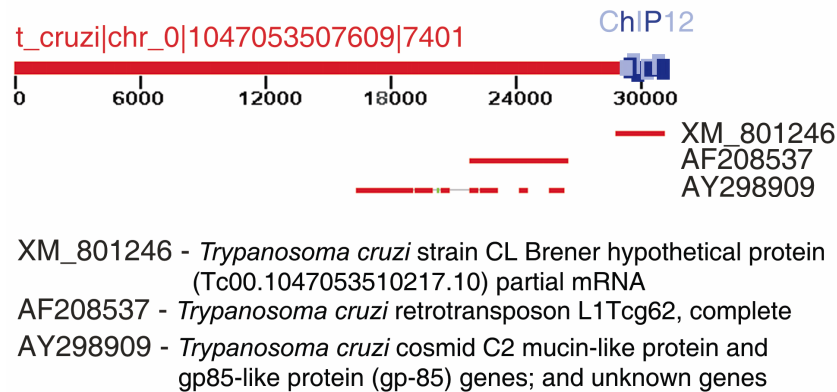
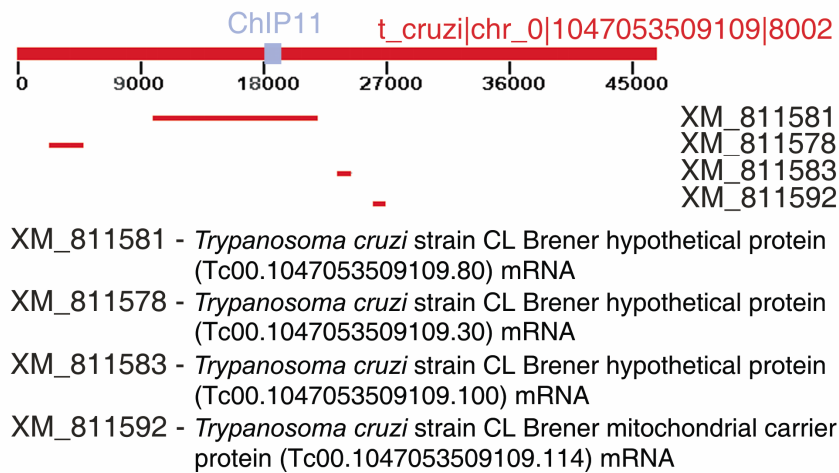
XM\_799840 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener hypothetical protein

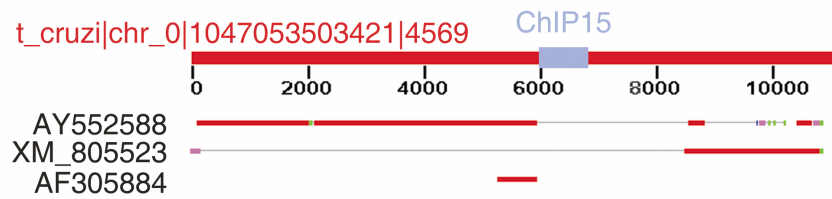
XM\_797768 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener UDP-Gal or UDP-GlcNAc-dependent glycosyltransferase (Tc00.1047053506379.10) mRNA

XM\_807476 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener RNA polymerase IIA largest subunit (Tc00.1047053509011.20) mRNA

XM\_807477 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener hypothetical protein (Tc00.1047053509011.30) mRNA



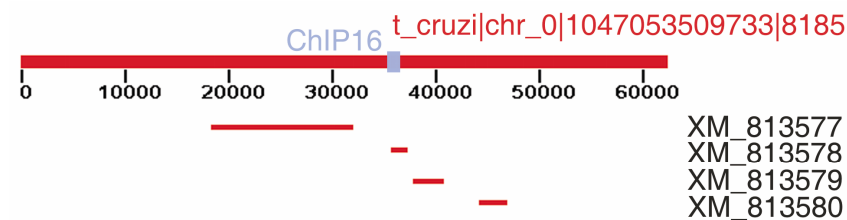




AY552588 - *Trypanosoma cruzi* clone C6:24B7 telomeric region

XM\_805523 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener retrotransposon hot spot (RHS) protein (Tc00.1047053505919.80) mRNA

AF305884 - *Trypanosoma cruzi* clone TcTelBAC:F7 telomere-associated sequence

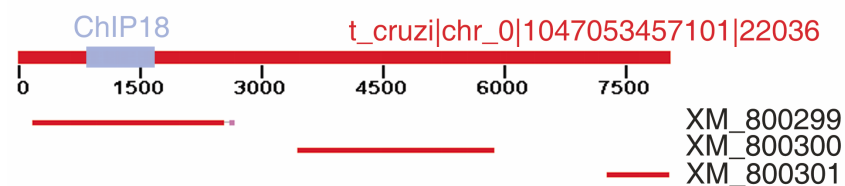


XM\_813577 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener hypothetical protein (Tc00.1047053509733.90) partial mRNA

XM\_813578 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener translation elongation factor 1-beta (Tc00.1047053509733.100) partial mRNA

XM\_813579 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener hypothetical protein (Tc00.1047053509733.110) partial mRNA

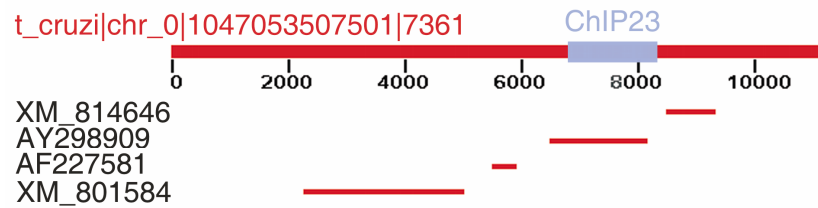
XM\_813580 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener hypothetical protein (Tc00.1047053509733.120) partial mRNA



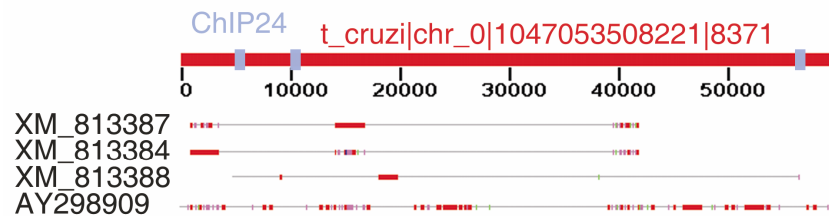
XM\_800299 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener hypothetical protein (Tc00.1047053457101.10) partial mRNA

XM\_800300 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener dynein heavy chain, cytosolic (Tc00.1047053457101.20) partial mRNA

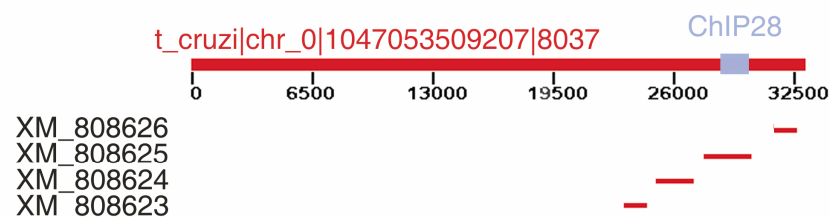
XM\_800301 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener multidrug resistance protein E (Tc00.1047053457101.30) partial mRNA



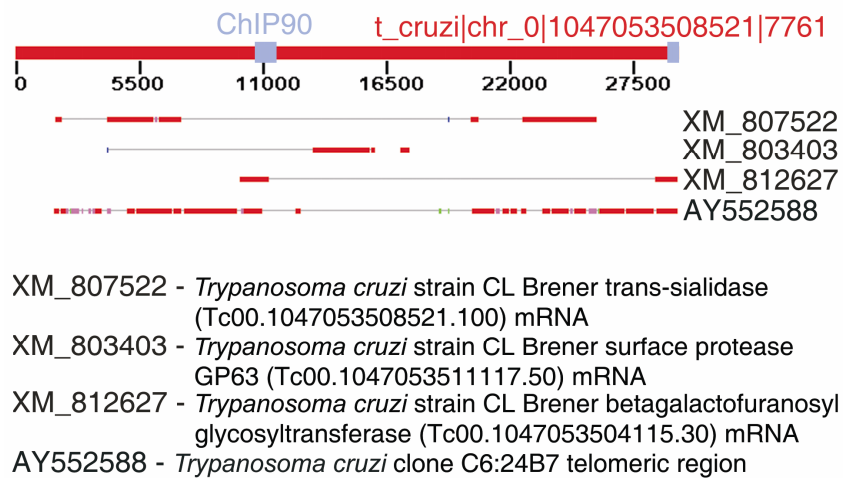
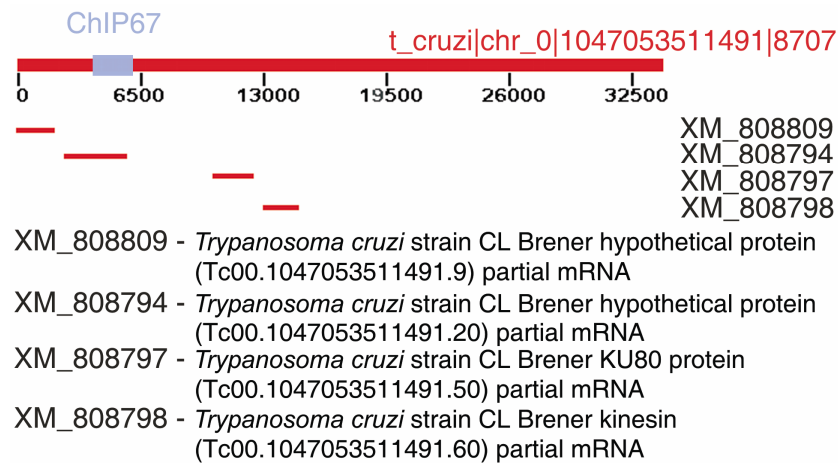
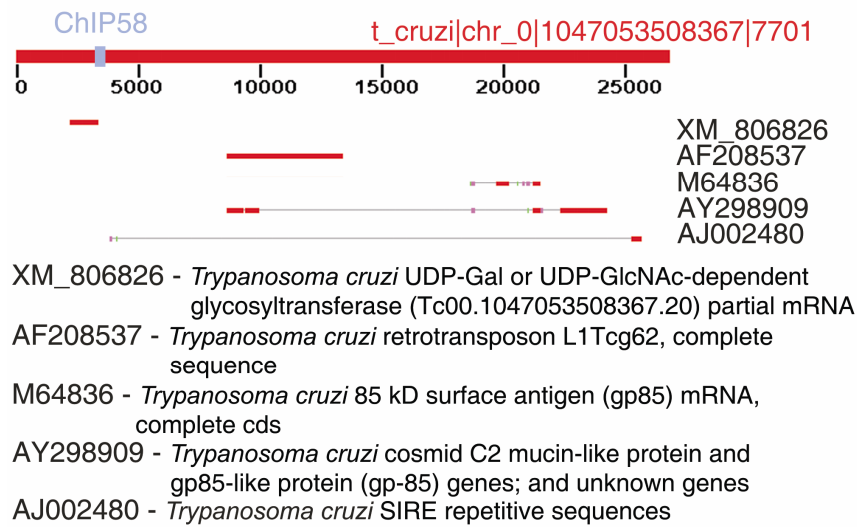
- XM\_814646 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener hypothetical protein (Tc00.1047053506537.240) partial mRNA  
 AY298909 - *Trypanosoma cruzi* cosmid C2 mucin-like protein and gp85-like protein (gp-85) genes; and unknown genes  
 AF227581 - *Trypanosoma cruzi* SIRE repeat region  
 XM\_801584 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener retrotransposon hot spot (RHS) protein (Tc00.1047053507501.10) mRNA



- XM\_813387 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener trans-sialidase (Tc00.1047053510361.80) partial mRNA  
 XM\_813384 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener trans-sialidase (Tc00.1047053510361.10) partial mRNA  
 XM\_813388 - *Trypanosoma cruzi* surface protease GP63 (Tc00.1047053510361.90) partial mRNA  
 AY298909 - *Trypanosoma cruzi* cosmid C2 mucin-like protein and gp85-like protein (gp-85) genes; and unknown genes



- XM\_808626 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener proteasome regulatory ATPase subunit 1 (Tc00.1047053509207.160) partial mRNA  
 XM\_808625 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener kinesin (Tc00.1047053509207.150) partial mRNA  
 XM\_808624 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener hypothetical protein (Tc00.1047053509207.140) partial mRNA  
 XM\_808623 - *Trypanosoma cruzi* strain CL Brener hypothetical protein (Tc00.1047053509207.130) partial mRNA



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARONSON, R.P. & BLOBEL, G. On the attachment of the nuclear pore complex. **J. Cell. Biol.** 62: 746-754, 1974.
- AARONSON, R.P. & BLOBEL, G. Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 72: 1007-1011, 1975.
- AEBI, U.; COHN, J.; BUHLE, L.; GERACE, L. The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. **Nature** 323: 560-564, 1986.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular biology of the cell*. 4<sup>th</sup> ed. New York: Garland Science, 2002.
- ALLEN, T.D.; CRONSHAW, J.M.; BAGLEY, S.; KISELEVA, E.; GOLDBERG, M.W. The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. **J. Cell Sci.** 113: 1651-1659, 2000.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.** 25: 3389-3402, 1997.
- ASTOLFI FILHO, S.; MARTINS de SÁ, C.; GANDER, E.S. On the chromatin structure of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 1: 45-53, 1980.
- BALAKRISHNAN, R.; CHRISTIE, K.R.; COSTANZO, M.C.; DOLINSKI, K.; DWIGHT, S.S.; ENGEL, S.R.; FISK, D.G.; HIRSCHMAN, J.E.; HONG, E.L.; NASH, R.; OUGHTRED, R.; SKRZYPEK, M.; THEESFELD, C.L.; BINKLEY, G.; LANE, C.; SCHROEDER, M.; SETHURAMAN, A.; DONG, S.; WENG, S.; MIYASATO, S.; ANDRADA, R.; BOTSTEIN, D.; CHERRY, J.M. Saccharomyces Genome Database Disponível em: < <http://www.yeastgenome.org> > Acesso em: 20 de jan. 2006.
- BARICHEVA, E.A.; BERRIOS, M.; BOGACHEV, S.S.; BORISEVICH, I.V.; LAPIK, E.R.; SHARAKHOV, I.V.; STUURMAN, N.; FISHER, P.A. DNA from *Drosophila melanogaster*  $\beta$ -heterochromatin binds specifically to nuclear lamins in vitro and the nuclear envelope in situ. **Gene** 171: 171-176, 1996.
- BARRY, J.D.; GINGER, M.L.; BURTON, P.; McCULLOCH, P.B. Why are parasite contingency genes often associated with telomeres? **Int. J. Parasitol.** 33: 29-45, 2003.
- BELLI, S.I. Chromatin remodelling during the life cycle of trypanosomatids. **Int. J. Parasitol.** 30: 679-687, 2000.
- BELMONT, A.S.; ZHAI, Y.; THILENIUS, A. Lamin B distribution and association with peripheral chromatin revealed by optical sectioning and electron microscopy tomography. **J. Cell Biol.** 123: 1671-1685, 1993.

- BLUMENTHAL, S.S.D.; CLARK, G.B.; ROUX, S.J. Biochemical and immunological characterization of pea nuclear intermediate filament proteins. **Planta** 218: 965-975, 2004.
- BOHM, F.; KAPPES, F.; SCHOLTEN, I.; RICHTER, N.; MATSUO, H.; KNIPPERS, R.; WALDMANN, T. The SAF-box domain of chromatin protein DEK. **Nucleic Acids Res.** 33: 1101-1110, 2005.
- BONALDO, M.C., SOUTO-PADRON, T., de SOUZA, W., Goldenberg, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **J. Cell. Biol.** 106: 1349-1358, 1988.
- BONTEMPI, E.J.; PORCEL, B.M.; HENRIKSSON, J.; CARLSSON, L.; RYDAKER, M.; SEGURA, E.L.; RUIZ, A.M.; PETTERSSON, U. Genes for histone H3 in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 66: 147-151, 1994.
- BORDE, V. & DUGUET, M. The mapping of DNA topoisomerase sites in vivo: a tool to enlight the functions of topoisomerases. **Biochimie** 80: 223-233, 1998.
- BRIDGER, J.M.; KILL, I.R.; O'FARRELL, M.; HUTCHISON, C.J. Internal lamin structures within G1 nuclei of human dermal fibroblasts. **J. Cell Sci.** 104: 297-306, 1993.
- BROERS, J.L.V.; MACHIELS, B.M.; van EYS, G.J.J.M.; KUIJPERS, H.J.H.; MANDERS, E.M.M.; van DRIEL, R.; RAMAEKERS, F.C.S. Dynamic of the nuclear lamina as monitored by GFP-tagged A-type lamins. **J. Cell Sci.** 112: 3463-3475, 1999.
- BURKE, B. The nuclear envelope: filling in gaps. **Nat. Cell Biol.** 3: E273-274, 2001.
- BURKHARD, P.; STETEFELD, J.; STRELKOV, S.V. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. **Trends Cell Biol.** 11:82-88, 2001.
- BYSTRICKY, K.; LAROCHE, T.; van HOUWE, G.; BLASZCZYK, M.; GASSER, S.M. Chromosome looping in yeast: telomere pairing and coordinated movement reflect anchoring efficiency and territorial organization. **J. Cell Biol.** 168: 375-387, 2005.
- CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: I. Origin of metacyclic trypomastigotes in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 6: 93-100, 1964.
- CANO, M.I.N. Telomere biology of trypanosomatids: more questions than answers. **Trends Parasitol.** 17: 425-429, 2001.
- CASOLARI, J.M.; BROWN, C.R.; KOMILI, S.; WEST, J.; HIERONYMUS, H.; SILVER, P.A. Genome-wide localization of the nuclear transport machinery couples transcriptional status and nuclear organization. **Cell** 117: 427-439, 2004.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1: 159-218, 1909.
- CHANG, C.R.; WU, C.S.; HOM, Y.; GARTENBERG, M.R. Targeting of cohesin by transcriptionally silent chromatin. **Genes Dev.** 19: 3031-3042, 2005.

- CHIURILLO, M.A.; CANO, I.; da SILVEIRA, J.F.; RAMIREZ, J.L. Organization of telomeric and sub-telomeric regions of chromosomes from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 100: 173-183, 1999.
- CHUNG, H.M.; SHEA, C.; FIELDS, S.; TAUB, R.N.; van der PLOEG, L.H.; TSE, D.B. Architectural organization in the interphase nucleus of the protozoan *Trypanosoma brucei*: location of telomeres and mini-chromosomes. **EMBO J.** 9: 2611-2619, 1990.
- COHEN, M.; LEE, K.K.; WILSON, K.L.; GRUENBAUM, Y. Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina. **Trends Biochem. Sci.** 26: 41-47, 2001.
- CONTRERAS, V.T., MOREL, C.M., GOLDENBERG, S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.** 14: 83-96, 1985a.
- CONTRERAS, V.T.; SALLES, J.M.; THOMAS, N.; MOREL, C.M.; GOLDENBERG, S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol. Biochem. Parasitol.** 16: 315-327, 1985b.
- CRAIG, J.M. Heterochromatin – many flavours, common themes. **BioEssays** 27: 17-28, 2004.
- D'ANGELO, M.A. & HETZER M.W. The role of the nuclear envelope in cellular organization. **Cell. Mol. Life Sci.** 63: 316-332, 2006.
- da CUNHA, J.P.; NAKAYASU, E.S.; ELIAS, M.C.; PIMENTA, D.C.; TELLEZ-INON, M.T.; ROJAS, F.; MUNOZ, M.J.; ALMEIDA, I.C.; SCHENKMAN, S. *Trypanosoma cruzi* histone H1 is phosphorylated in a typical cyclin dependent kinase site accordingly to the cell cycle. **Mol. Biochem. Parasitol.** 140: 75-86, 2005.
- da SILVEIRA, J.F. Biologia molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.127-152.
- de SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Pharm. Design** 8: 269-285, 2002.
- de SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2<sup>a</sup>. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.88-126.
- DECOSTRE, V.; BEN YAOU, R.; BONNE, G. Laminopathies affecting skeletal and cardiac muscles: clinical and pathophysiological aspects. **Acta Myol.** 24: 104-109, 2005.
- DUNDR, M. & MISTELI, T. Functional architecture in the cell nucleus. **Biochem. J.** 356: 297-310, 2001.
- ELIAS, M.C.; MARQUES-PORTO, R.; FREYMULLER, E.; SCHENKMAN, S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. **Mol. Biochem. Parasitol.** 112: 79-90, 2001.

- ELIAS, M.C.Q.B.; FARIA, M.; MORTARA, R.A.; MOTTA, M.C.M.; de SOUZA, W.; THIRY, M.; SCHENKMAN, S. Chromosome location changes in the *Trypanosoma cruzi* nucleus. **Eukaryot. Cell** 1: 944-953, 2002.
- ELLIS, D.J.; JENKINS, H.; WHITFIELD, W.G.; HUTCHISON, C.J. GST-lamin fusion proteins act as dominant negative mutants in *Xenopus* egg extract and reveal the function of the lamina in DNA replication. **J. Cell Sci.** 110: 2507-2518, 1997.
- EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BARTHOLOMEU, D.C.; NILSSON, D.; AGGARWAL, G.; TRAN, A.N.; GHEDIN, E.; WORTHEY, E.A.; DELCHER, A.L.; BLANDIN, G.; WESTENBERGER, S.J.; CALER, E.; CERQUEIRA, G.C.; BRANCHE, C.; HAAS, B.; ANUPAMA, A.; ARNER, E.; ASLUND, L.; ATTIPOE, P.; BONTEMPI, E.; BRINGAUD, F.; BURTON, P.; CADAG, E.; CAMPBELL, D.A.; CARRINGTON, M.; CRABTREE, J.; DARBAN, H.; da SILVEIRA, J.F.; de JONG, P.; EDWARDS, K.; ENGLUND, P.T.; FAZELINA, G.; FELDBLYUM, T.; FERELLA, M.; FRASCH, A.C.; GULL, K.; HORN, D.; HOU, L.; HUANG, Y.; KINDLUND, E.; KLINGBEIL, M.; KLUGE, S.; KOO, H.; LACERDA, D.; LEVIN, M.J.; LORENZI, H.; LOUIE, T.; MACHADO, C.R.; McCULLOCH, R.; McKENNA, A.; MIZUNO, Y.; MOTTRAM, J.C.; NELSON, S.; OCHAYA, S.; OSOEGAWA, K.; PAI, G.; PARSONS, M.; PENTONY, M.; PETTERSSON, U.; POP, M.; RAMIREZ, J.L.; RINTA, J.; ROBERTSON, L.; SALZBERG, S.L.; SANCHEZ, D.O.; SEYLER, A.; SHARMA, R.; SHETTY, J.; SIMPSON, A.J.; SISK, E.; TAMMI, M.T.; TARLETON, R.; TEIXEIRA, S.; van AKEN, S.; VOGT, C.; WARD, P.N.; WICKSTEAD, B.; WORTMAN, J.; WHITE, O.; FRASER, C.M.; STUART, K.D.; ANDERSSON, B. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science** 309: 409-415, 2005a.
- EL-SAYED, N.M.; MYLER, P.J.; BLANDIN, G.; BERRIMAN, M.; CRABTREE, J.; AGGARWAL, G.; CALER, E.; RENAULD, H.; WORTHEY, E.A.; HERTZ-FOWLER, C.; GHEDIN, E.; PEACOCK, C.; BARTHOLOMEU, D.C.; HAAS, B.J.; TRAN, A.N.; WORTMAN, J.R.; ALSMARK, U.C.M.; ANGIUOLI, S.; ANUPAMA, A.; BADGER, J.; BRINGAUD, F.; CADAG, E.; CARLTON, J.M.; CERQUEIRA, G.C.; CREASY, T.; DELCHER, A.L.; DJIKENG, A.; EMBLEY, T.M.; HAUSER, C.; IVENS, A.C.; KUMMERFELD, S.K.; PEREIRA-LEAL, J.B.; NILSSON, D.; PETERSON, J.; SALZBERG, S.L.; SHALLOM, J.; SILVA, J.C.; SUNDARAM, J.; WESTENBERGER, S.; WHITE, O.; MELVILLE, S.E.; DONELSON, J.E.; ANDERSSON, B.; STUART, K.D.; HALL, N. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science** 309: 404-409, 2005b.
- ENGELMAN, D.M.; STEITZ, T.A.; GOLDMAN, A. Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. **Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.** 15: 321-353, 1986.
- ERSFELD, K.; MELVILLE, S.E.; GULL, K. Nuclear and genome organization of *Trypanosoma brucei*. **Parasitol. Today** 15: 58-63, 1999.
- FAHRENKROG, B. & AEBI, U. The nuclear pore complex: nucleocytoplasmic transport and beyond. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.** 4: 757-766, 2003.



- FIGUEIREDO, L.M.; FREITAS-JUNIOR, L.H.; BOTTIUS, E.; LIVO-MARIN, J.C.; SCHERF, A. A central role for *Plasmodium falciparum* subtelomeric regions in spatial positioning and telomere length regulation. **EMBO J.** 21: 815-824, 2002.
- FISHER, D.Z.; CHAUDHARY, N.; BLOBEL, G. cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 83: 6450-6454, 1986.
- FOISNER, R. Inner nuclear membrane proteins and the nuclear lamina. **J. Cell Sci.** 114: 3791-3792, 2001.
- FOSTER, H.A. & BRIDGER, J.M. The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. Genome organisation and nuclear architecture. **Chromosoma** 114: 212-229, 2005.
- FRAGOSO, S.P. & GOLDENBERG, S. Cloning and characterization of the gene encoding *Trypanosoma cruzi* DNA topoisomerase II. **Mol. Biochem. Parasitol.** 55: 127-134, 1992.
- FRAGOSO, S.P.; MATTEI, D.; HINES, J.C.; RAY, D.; GOLDENBERG, S. Expression and cellular localization of *Trypanosoma cruzi* type II DNA topoisomerase. **Mol. Biochem. Parasitol.** 94: 197-204, 1998.
- FRANKE, W.W. Structure, biochemistry and function of the nuclear envelope. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** 268: 67-93, 1974.
- FREITAS-JUNIOR, L.H.; BOTTIUS, E.; PIRRI, L.A.; DEITSCH, K.W.; SCHEIDIG, C.; GUINET, F.; NEHRBASS, U.; WELLEMS, T.E.; SCHERF, A. Frequent ectopic recombination of virulence factor genes in telomeric chromosome cluster of *P. falciparum*. **Nature** 407: 1018-1022, 2000.
- GERACE, L. & BURKE, B. Functional organization of the nuclear envelope. **Annu. Rev. Cell Biol.** 4: 335-374, 1988.
- GINDULLIS, F. & MEIER, I. Matrix attachment region binding protein MFP1 is localized in discrete domains at the nuclear envelope. **Plant Cell** 11: 1117-1128, 1999.
- GINDULLIS, F.; ROSE, A.; PATEL, S.; MEIER, I. Four signature motifs define the first class of structurally related large coiled-coil proteins in plants. **BMC Genomics** 3:9, 2002.
- GLYNN, E.F.; MEGEE, P.C.; YU, H.G.; MISTROT, C.; UNAL, E.; KOSHLAND, D.E.; DeRISI, J.L.; GERTON, J.L. Genome-wide mapping of the cohesin complex in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS Biol** 2: E259, 2004.
- GOLDMAN, A.E.; MOIR, R.D.; MONTAG, L.M.; STEWART, M.; GOLDMAN, R.D. Pathway of incorporation of microinjected lamin A into the nuclear envelope. **J. Cell Biol.** 119: 725-735, 1992.
- GOLDMAN, R.D.; GOLDMAN, A.E.; SHUMAKER, D.K. Nuclear lamins: building blocks of nuclear structure and function. **Novartis Found. Symp.** 264: 3-16, 2005.

- GOTTA, M.; LAROCHE, T.; FORMENTON, A.; MAILLET, L.; SCHERTHAN, H.; GASSER, S.M. The clustering of telomeres and colocalization with Rap1, Sir3, and Sir4 proteins in wild-type *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Cell Biol.** 134: 1349-1363, 1996.
- GRUENBAUM, Y.; GOLDMAN, R.D.; MEYUHAS, R.; MILLS, E.; MARGALIT, A.; FRIDKIN, A.; DAYANI, Y.; PROKOCIMER, M.; ENOSH, A. The nuclear lamina and its functions in the nucleus. **Int. Rev. Cytol.** 226: 1-62, 2003.
- GRUENBAUM, Y.; MARGALIT, A.; GOLDMAN, R.D.; SHUMAKER, D.K.; WILSON, K.L. The nuclear lamina comes of age. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 6:21-31, 2005.
- GRUENBAUM, Y.; WILSON, K.L.; HAREL, A.; GOLDBERG, M.; COHEN, M. Review: Nuclear Lamins – structural proteins with fundamental functions. **J. Struct. Biol.** 129: 313-323, 2000.
- HARDER, P.A.; SILVERSTEIN, R.A.; MEIER, I. Conservation of matrix attachment region-binding filament-like protein 1 among higher plants. **Plant Physiol.** 122: 225-234, 2000.
- HARRIS, H. *The birth of the cell*. New Haven: Yale University Press, 1999.
- HECKER, H. & GANDER, E.S. The compaction pattern of the chromatin of trypanosomes. **Biol. Cell** 53: 199-208, 1985.
- HECKER, H.; BETSCHART, B.; BENDER, K.; BURRI, M.; SCHLIMME, W. The chromatin of trypanosomes. **Int. J. Parasitol.** 24: 809-819, 1994.
- HEDIGER, F.; DUBRANA, K.; GASSER, S.M. Myosin-like proteins 1 and 2 are not required for silencing or telomere anchoring, but act in the Tel1 pathway of telomere length control. **J. Struct. Biol.** 140: 79-91, 2002a.
- HEDIGER, F.; NEUMANN, F.R.; van HOUWE, G.; DUBRANA, K.; GASSER, S.M. Live imaging of telomeres: yKu and Sir proteins define redundant telomere-anchoring pathways in yeast. **Curr. Biol.** 12: 2076-2089, 2002b.
- HERRMAN, F. and FACKELMAYER, F.O. Nuclear architecture – on higher ground. **Chromosome Res.** 13: 3-8, 2005.
- HORTON, P. & NAKAI, K. Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. **Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.** 5: 147-152, 1997.
- HOZÁK, P.; SASSEVILLE, M.J.; RAYMOND, Y.; COOK, P.R. Lamin proteins form an internal nucleoskeleton as well as a peripheral lamina in human cells. **J. Cell Sci.** 108: 635-644, 1995.
- HUTCHISON, C.J. Lamins: building blocks or regulators of gene expression? **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 3: 848-858, 2002.
- HUTCHISON, C.J.; BRIDGER, J.M.; COX, L.S.; KILL, I.R. Weaving a pattern from disparate threads: lamin function in nuclear assembly and DNA replication. **J. Cell Sci.** 107: 3259-3269, 1994.

- JAGATHEESAN, G.; THANUMALAYAN, S.; MURALIKRISHNA, Bh.; RANGARAJ, N.; KARANDE, A.A.; PARNAIK, V.K. Colocalization of intranuclear lamin foci with RNA splicing factors. **J. Cell Sci.** 112: 4651-4661, 1999.
- KARLINSEY, J.; STAMATOYANNOPOULOUS, S.; ENVER, T. Simultaneous purification of DNA and RNA from small number of eukaryotic cells. **Anal. Biochem.** 180: 303-306, 1989.
- KIM, D.; CHIURILLO, M.A.; EL-SAYED, N.; JONES, K.; SANTOS, M.R.M.; PORCILE, P.E.; ANDERSSON, B.; MYLER, P.; da SILVEIRA, J.F.; RAMÍREZ, J.L. Telomere and subtelomere of *Trypanosoma cruzi* chromosomes are enriched in (pseudo)genes of retrotransposon hot spot and trans-sialidase-like gene families: the origins of *T. cruzi* telomeres. **Gene** 346: 153-161, 2005.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680-685, 1970.
- LAMOND, A.I. & EARNSHAW, W.C. Structure and function in the nucleus. **Science** 280: 547-553, 1998.
- LENZ-BÖHME, B.; WISMAR, J.; FUCHS, S.; REIFEGERSTE, R.; BUCHNER, E.; BETZ, H.; SCHMITT, B. Insertional mutation of the *Drosophila* nuclear lamin *dm<sub>0</sub>* gene results in defective nuclear envelopes, clustering of nuclear pore complexes and accumulation of annulate lamellae. **J. Cell Biol.** 137: 1001-1016, 1997.
- LIU, J.; ROLEF-BEN SHAHAR, T.; RIEMER, D.; TREININ, M.; SPANN, P.; WEBER, K.; FIRE, A.; GRUENBAUM, Y. Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression and spatial organization of nuclear pore complexes. **Mol. Biol. Cell** 11: 3937-3947, 2000.
- LODÉN, M. & van STEENSEL, B. Whole-genome views of chromatin structure. **Chromosome Res.** 13: 289-298, 2005.
- LOPEZ-VELAZQUEZ, G.; HERNANDEZ, R.; LOPEZ-VILLASENOR, I.; REYES-VIVAS, H.; VALDEZ, M. de L.; JIMENEZ-GARCIA, L.F. Electron microscopy analysis of the nucleolus of *Trypanosoma cruzi*. **Microsc. Microanal.** 11: 293-299, 2005.
- LOWELL, J.E. & CROSS, G.A. A variant histone H3 is enriched at telomeres in *Trypanosoma brucei*. **J. Cell Sci.** 117: 5937-5947, 2004.
- LOWELL, J.E.; KAISER, F.; JANZEN, C.J.; CROSS, G.A. Histone H2AZ dimerizes with a novel variant H2B and is enriched at repetitive DNA in *Trypanosoma brucei*. **J. Cell Sci.** 118: 5721-5730, 2005.
- LUDÉRUS, M.E.E.; den BLAAUWEN, J.L.; de SMIT, O.J.B.; COMPTON, D.A.; van DRIEL, R. Binding of matrix attachment regions to lamin polymers involves single-stranded regions and the minor groove. **Mol. Cell. Biol.** 14: 6297-6305, 1994.

- MANS, B.J.; ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L.; KOONIN, E.V. Comparative genomics, evolution and origins of the nuclear envelope and nuclear pore complex. **Cell Cycle** 3: 1612-1637, 2004.
- MARALDI, N.M. & LATTANZI, G. Linkage of lamins to fidelity of gene transcription. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.** 15: 277-294, 2005.
- MARALDI, N.M.; LATTANZI, G.; CAPANNI, C.; COLUMBARO, M.; MERLINI, L.; MATTIOLI, E.; SABATELLI, P.; SQUARZONI, S.; MANZOLI, F.A. Nuclear envelope proteins and chromatin arrangement: a pathogenic mechanism for laminopathies. **Eur. J. Histochem.** 50: 1-8, 2006.
- MARCHLER-BAUER, A.; ANDERSON, J.B.; CHERUKURI, P.F.; DEWEESE-SCOTT, C.; GEER, L.Y.; GWADZ, M.; HE, S.; HURWITZ, D.I.; JACKSON, J.D.; KE, Z.; LANCZYCKI, C.J.; LIEBERT, C.A.; LIU, C.; LU, F.; MARCHLER, G.H.; MULLOKANDOV, M.; SHOEMAKER, B.A.; SIMONYAN, V.; SONG, J.S.; THIESSEN, P.A.; YAMASHITA, R.A.; YIN, J.J.; BRYANT, S.H. CDD: a conserved domain database for protein classification. **Nucleic Acids Res.** 33: Database Issue:D192-6, 2005.
- MARQUES PORTO, R.; AMINO, R.; ELIAS, M.C.; FARIA, M.; SCHENKMAN, S. Histone H1 is phosphorylated in non-replicating and infective forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 119: 265-271, 2002.
- MARSHALL, W.F. & SEDAT, J.W. Nuclear architecture. **Results Probl. Cell Differ.** 25: 283-301, 1999.
- MASUDA, K.; XU, Z.-J.; TAKAHASHI, S.; ITO, A.; ONO, M.; NOMURA, K.; INOUE, M. Peripheral framework of carrot cell nucleus contains a novel protein predicted to exhibit a long  $\alpha$ -helical domain. **Exp. Cell Res.** 232: 173-181, 1997.
- MATTOUT-DRUBEZKI, A. & GRUENBAUM, Y. Dynamic interactions of nuclear lamina proteins with chromatin and transcriptional machinery. **Cell. Mol. Life Sci.** 60: 2053-2063, 2003.
- MEIER, I.; PHELAN, T.; GRUISSSEN, W.; SPIKER, S.; SCHNEIDER, D. MPF1, a novel plant filament-like protein with affinity for matrix attachment region DNA. **Plant Cell** 8: 2105-2115, 1996.
- MENON, B.B.; SARMA, N.J.; PASULA, S.; DEMINOFF, S.J.; WILLIS, K.A.; BARBARA, K.E.; ANDREWS, B.; SANTANGELO, G.M. Reverse recruitment: the Nup84 nuclear pore subcomplex mediates Rap1/Gcr1/Gcr2 transcriptional activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 102: 5749-5754, 2005.
- MEWES, H.W.; HANI, J.; PFEIFFER, F.; FRISHMAN, D. MIPS: a database for protein sequences and complete genomes. **Nucleic Acids Res.** 26: 33-37, 1998.
- MISTELI, T. Concepts in nuclear architecture. **Bioessays.** 27: 477-487, 2005.

- MOIR, R.D. and SPANN, T.P. The structure and function of nuclear lamins: implications for disease. **Cell. Mol. Life Sci.** 58: 1748-1757, 2001.
- MOIR, R.D.; MONTAG-LOWY, M.; GOLDMAN, R.D. Dynamic properties of nuclear lamins: lamin B is associated with sites of DNA replication. **J. Cell Biol.** 125: 1201-1212, 1994.
- MOIR, R.D.; SPANN, T.P.; GOLDMAN, R.D. The dynamic properties and possible functions of nuclear lamins. **Int. Rev. Cytol.** 162B: 141-182, 1995.
- MOIR, R.D.; SPANN, T.P.; HERRMANN, H.; GOLDMAN, R.D. Disruption of nuclear lamin organization blocks the elongation phase of DNA replication. **J. Cell Biol.** 149: 1179-1191, 2000.
- MOREL, C.M. & LAZDINS, J. Chagas disease. **Nat. Rev. Microbiol.** 1: 14-15, 2003. doi:10.1038/nmicro735
- NAVARRO, M. & GULL, K. A pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in *Trypanosoma brucei*. **Nature** 414: 759-63, 2001.
- NGUYEN, T.N. & GOODRICH, J.A. Protein-protein interaction assays: eliminating false positive interactions. **Nature Meth.** 3: 135-139, 2006.
- OGBADOYI, E.; ERSFELD, K.; ROBINSON, D.; SHERWIN, T.; GULL, K. Architecture of the *Trypanosoma brucei* nucleus during interphase and mitosis. **Chromosoma** 108: 501-513, 2000.
- PARRY, D.A. Coiled-coils in alpha-helix-containing proteins: analysis of the residue types within the heptad repeat and the use of these data in the prediction of coiled-coils in other proteins. **Biosci. Rep.** 2: 1017-1024, 1982.
- PEREZ-MORGA, D.; AMIGUET-VERCHER, A.; VERMIJLEN, D.; PAYS, E. Organization of telomeres during the cell and life cycle of *Trypanosoma brucei*. **J. Eukaryot. Microbiol.** 48: 221-226, 2001.
- PUERTA, C.; MARTIN, J.; ALONSO, C.; LOPEZ, M.C. Isolation and characterization of the gene encoding histone H2A from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 64: 1-10, 1994.
- RECINOS, R.F.; KIRCHHOFF, L.V.; DONELSON, J.E. Cell cycle expression of histone genes in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 113: 215-222, 2001.
- ROUT, M.P. & AITCHISON, J.D. The nuclear pore complex as a transport machine. **J. Biol. Chem.** 276: 16593-16596, 2001.
- ROUT, M.P. and FIELD, M.C. Isolation and characterization of subnuclear compartments from *Trypanosoma brucei*: identification of a major repetitive nuclear lamina component. **J. Biol. Chem.** 276: 38261-38271, 2001.

- ROUT, M.P.; AITCHISON, J.D.; SUPRAPTO, A.; HJERTAAS, K.; ZHAO, Y.; CHAIT, B.T. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture and transport mechanism. **J. Cell Biol.** 148: 635-651, 2000.
- RUBIO, J.; ROSADO, Y.; CASTANEDA, M. Subunit structure of *Trypanosoma cruzi* chromatin. **Can. J. Biochem.** 58: 1247-1251, 1980.
- RZEPECKI, R.; BOGACHEV, S.S.; KOKOZA, E.; STUURMAN, N.; FISHER, P.A. In vivo association of lamins with nucleic acids in *Drosophila melanogaster*. **J. Cell Sci.** 111: 121-129, 1998.
- SABAJ, V.; ASLUND, L.; PETTERSSON, U.; GALANTI, N. Histone genes expression during the cell cycle in *Trypanosoma cruzi*. **J. Cell. Biochem.** 80: 617-624, 2001.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; and MANIATIS, T. Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- SCHIRMER, E.C. & GERACE L. The nuclear membrane proteome: extending the envelope. **Trends Biochem. Sci.** 30: 551-558, 2005.
- SHOEMAN, R.L. & TRAUB, P. The in vitro DNA-binding properties of purified nuclear lamin proteins and vimentin. **J. Biol. Chem.** 265: 9055-9061, 1990.
- SPADILIERO, B.; NICOLINI, C.; MASCETTI, G.; HENRÍQUEZ, D.; VERGANI, L. Chromatin of *Trypanosoma cruzi*: in situ analysis revealed its unusual structure and nuclear organization. **J. Cell. Biochem.** 85: 798-808, 2002a.
- SPADILIERO, B.; SÁNCHEZ, F.; SLEZYNGER, T.C.; HENRÍQUEZ, D.A. Differences in the nuclear chromatin among various stages of the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. **J. Cell. Biochem.** 84: 832-839, 2002b.
- SPANN, T.P.; GOLDMAN, A.E.; WANG, C.; HUANG, S.; GOLDMAN, R.D. Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II-dependent transcription. **J. Cell Biol.** 156: 603-608, 2002.
- SPECTOR, D.L. Macromolecular domains within the cell nucleus. **Annu. Rev. Cell Biol.** 9: 265-315, 1993.
- STRAUSS, P.R. & WANG, J.C. The TOP2 gene of *Trypanosoma brucei*: a single copy gene that shares extensive homology with other TOP2 genes encoding eukaryotic DNA topoisomerase II. **Mol. Biochem. Parasitol.** 38: 141-150, 1990.
- STUURMAN, N.; HEINS, S. & AEBI, U. Nuclear lamins: their structure, assembly and interactions. **J. Struct. Biol.** 122: 42-66, 1998.
- TADDEI, A.; HEDIGER, F.; NEUMANN, F.R.; GASSER, S.M. The function of nuclear architecture: a genetic approach. **Annu. Rev. Genet.** 38: 305-345, 2004.
- TDR/WHO. **Tropical disease research: progress 2003-2004**. Seventeenth programme report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO special programme for research & training in tropical diseases. Geneva, 2005.

- TORO, G.C. & GALANTI, N. H1 histone variants in *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Cell Res.** 174: 16-24, 1988.
- TORO, G.C. & GALANTI, N. *Trypanosoma cruzi* histones. Further characterization and comparison with higher eukaryotes. **Biochem. Int.** 21: 481-490, 1990.
- TORO, G.C.; WERNSTEDT, C.; HELLMAN, U.; GALANTI, N. Presence of histone H2B in *Trypanosoma cruzi* chromatin. **Bio. Res.** 26: 41-6, 1993.
- TORO, G.C.; WERNSTEDT, C.; MEDINA, C.; JARAMILLO, N.; HELLMAN, U.; GALANTI, N. Extremely divergent histone H4 sequence from *Trypanosoma cruzi*: evolutionary implications. **J. Cell. Biochem.** 49: 266-271, 1992.
- TOWBIN, H.; STAEBLIN, T. and BORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 76: 4350-4354, 1979.
- VERSCHURE, P.J. Positioning the genome within the nucleus. **Biol. Cell** 96: 569-577, 2004.
- VICKERMAN, K. & PRESTON, T.M. Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. **J. Cell Sci.** 6: 365-383, 1970.
- von KRIES, J.P.; BUHRMESTER, H.; STRATLING, W.H. A matrix/scaffold attachment region binding protein: identification, purification, and mode of binding. **Cell** 64: 123-135, 1991.
- WANG, B.D.; EYRE, D.; BASRAI, M.; LICHTEN, M.; STRUNNIKOV, A. Condensin binding at distinct and specific chromosomal sites in the *Saccharomyces cerevisiae* genome. **Mol. Cell. Biol.** 25: 7216-7225, 2005.
- WATSON, M.L. The nuclear envelope: its structure and relation to cytoplasmic membranes. **J. Bioph. Bioch. Cytol.** 1: 257-270, 1955.
- WEIS, K. Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. **Cell** 112: 441-451, 2003.
- WENTE, S.R. Gatekeepers of the nucleus. **Science** 288: 1374-1377, 2000.
- WIESLANDER, L. The cell nucleus. **Exp. Cell Res.** 296: 1-3, 2004.